

Ein Beitrag zur in-vitro Resistenztestung
aviärer Mycoplasmen

Klaus Raiber

1976

Klinik für Innere Krankheiten der Tiere
Lehrstuhl für Krankheiten des Hausgeflügels, der Zier-
und Zoovögel des Fachbereichs Tiermedizin der Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. I. Gylstorff

Ein Beitrag zur in- vitro Resistenztestung
aviärer Mycoplasmen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Klaus Raiber

aus
Ludwigsburg

München 1976



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Tiermedizin der Universität

München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. I. Gylstorff

Korreferent: Prof. Dr. J. Boch

Tag der Promotion: 27. Februar 1976

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit

Library of Congress



Manuscript and Archives

Department of the Interior

Division

Office

Chief, U. S. Geological Survey

Director

Chief, U. S. Geological Survey

Assistant

Chief, U. S. Geological Survey

U. S. Geological Survey

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A Einleitung	1
B Literatur	3
C Eigene Untersuchungen	
1. Versuchsplan	16
2. Material und Methoden	16
3. MIC - Bestimmung	19
4. Bestimmung von lag-phase und Keimtiteranstieg	21
5. Auswertung	22
D Ergebnisse	23
E Diskussion	32
F Zusammenfassung	41
G Summary	43
H Tabellen und Abbildungen	44
I Literaturverzeichnis	76
K Lebenslauf	87

A EINLEITUNG

Die Bedeutung verschiedener Mycoplasma- Species für den Ausbruch wirtschaftlich bedeutungsvoller Krankheiten und Leistungsminderungen beim Geflügel ist schon seit langem geklärt.

Therapeutisch werden beim Geflügel gegen Mycoplasmosen im wesentlichen Antibiotica der Macrolidgruppe, vor allem Tylosin und Spiramycin, verwendet. Gelegentlich kommen auch Lincomycin und Spectinomycin, sowie in neuester Zeit versuchsweise 81.723 hfu^x, zum Einsatz (YODER & HOFSTAD, 1965; BARNES et al., 1960 a, c; NEMTEANU et al., 1966; GERLACH, 1968; HAMDY & BLANCHARD, 1969; HAMDY et al., 1969; HAMDY, 1970; LABER & SCHÜTZE, 1975).

Diese kleine Zahl der für den ausgedehnten therapeutischen Gebrauch zur Verfügung stehenden Substanzen, von denen zudem die Macrolide Tylosin und Spiramycin noch voll kreuzresistent sind (KUNIYASU et al., 1974), läßt erwarten, daß es vor allem bei der Durchführung von Eradikationsprogrammen zum Auftreten von resistenten Stämmen kommt. Eine Resistenztestung sollte dann den therapeutischen Erfolg sichern helfen.

In der Literatur wird eine Vielzahl von Methoden zur Resistenzbestimmung beschrieben (ZOLLI & MUTH, 1956; NEWNHAM & CHU, 1965; YAMAMOTO & ADLER, 1956).

^x = Derivat des Pleuromutilin, das u. a. von dem Basidiomyceten *Pleurotus mutilis* produziert wird.

(Hersteller Fa. Sandoz, Basel)

Die Diffusionsmethoden haben sich bei langsam wachsenden Mikroorganismen nicht bewährt und sind daher für die Resistenztestung, auch bei Mycoplasmen nicht brauchbar (HEARN et al., 1959; FABRICANT et al., 1962) . Für solche Keimgruppen bietet sich der Reihenverdünnungstest im Röhrchen an. In der vorgelegten Arbeit soll die Anwendbarkeit dieses Testes für Mycoplasmen geprüft werden.

B LITERATUR

Die Mycoplasmen werden heute taxonomisch einer eigenen Klasse, den Mollicutes, zugeordnet. Diese Klasse enthält derzeit nur eine Familie - Mycoplasmataceae - mit 5 Genera. Mycoplasma wird bei ... FREUNDT (1974) als Genus 1 aufgeführt.

Mycoplasmen sind polymorphe Zellen, überwiegend sphärisch bis ovoid, mit einem Durchmesser von 125- 250 nm. Sie besitzen keine Zellwand wie Bakterien, sondern haben lediglich eine dreischichtige cholesterinhaltige Membran als Begrenzung gegenüber der Umwelt. Sie färben sich gram-negativ (FREUNDT, 1969; . . FREUNDT, 1974) .

Die Mycoplasmen sind die kleinsten Mikroorganismen, die sich im zellfreien Substrat vermehren können (BETTENCOURT, 1966) . Sie haben einen sehr viel kleineren Gen-satz als Bakterien und stellen sehr hohe Anforderungen an das Medium, in dem sie gezüchtet werden sollen. Verschiedene Nähr- und Wirkstoffe müssen nicht nur in der notwendigen Konzentration, sondern auch in einer incorporierbaren Form vorliegen (ADLER et al., 1954; RODWELL, 1969; . . . FREUNDT, 1974) .

Der Energiestoffwechsel der meisten Mycoplasmen-species erfolgt mittels Glycolyse oder Argininspaltung (BARBER & FABRICANT, 1971) . In Tabelle 1 sind die wichtigsten Geflügelstämme und deren Hauptenergiequelle aufgeführt.

Die meisten Mycoplasmen wachsen fakultativ anaerob, ob-

wohl meist das aerobe Milieu besseres Wachstum gestattet. Das Temperaturoptimum liegt bei 37 °C. Gutes Wachstum findet man bei einem pH- Wert von 7 und höher (RODWELL, 1969) .

Aufgrund der cholesterinhaltigen Membran sind die Mycoplasmen sehr empfindlich gegenüber oberflächenaktiven und lipolytischen Substanzen . (FREUNDT, 1974) . Sie sind gegenüber 1.000 - 10.000 i. E. Penicillin- G natürlich resistent, da ihnen eine Zellwand fehlt (COTTEW & LEACH, 1969) . Sie sind außerdem unempfindlich gegen Thalliumacetat im Konzentrationsbereich von 1: 2.000 - 1: 4.000 (HOROSZEWICZ, 1961) .

Nach BARBER & FABRICANT (1971) unterscheidet man heute beim Geflügel 10 Serotypen (siehe Tabelle 1) . Diese wurden mit Hilfe des Stoffwechselhemmtestes (MI- Test = Metabolic inhibition test) ermittelt. Die verschiedenen, zu einem Serotyp gehörenden Stämme verhalten sich biochemisch nicht absolut identisch (BARBER & FABRICANT, 1971) .

Tabelle 1
Die aviären Mycoplasmen und deren Hauptenergiequellen
nach BARBER & FABRICANT (1971)

<u>Serotyp</u>	<u>Speciesname</u>	<u>Glucose</u>	<u>Arginin</u>
A	M.gallisepticum	+	-
B, M	M.gallinarum	-	+
C, O		+	-
D, P		+	-
E	M.iners	-	+
F		+	-
H	M.meleagridis	-	+
I,J,K,N,Q,R		+	+
L	M.anatis	-	+
		+	-
S	M. synoviae	+	-

Die Schwierigkeiten bei der Anzüchtung haben dazu geführt, daß eine Vielzahl von Medien entwickelt wurde , wobei dem Grundmedium aus Fleischbouillon die verschiedensten Zusätze beigemischt wurden (ADLER et al., 1954) . Nach RODWELL (1969) müssen in einem Mycoplasmenmedium Cholesterin, Aminosäuren und Polypeptide, Mineralstoffe (vor allem Mangan) , Energiequellen (Glucose bzw. Arginin) und für einige Arten auch die reduzierte Form des Diphosphopyridinnucleotids vorhanden sein. Die Zusätze zur Fleischbouillon sind überwiegend Schweine- und Pferdesera, sowie Hefautolysate (SHARP, 1970) .

Eine weite Verbreitung haben die nachstehenden Medien erfahren:

- Chanock- Medium (CHANOCK et al., 1962)
- Beef heart infusion mit 10 % Schweineserum
(FABRICANT & FREUNDT, 1967)
- VF- Medium mit 10 % Schweineserum
(BARBER & FABRICANT, 1962)
- PPLO- Agar und Broth mit 10 % Pferdeserum und 1 % Hefautolysat
(ADLER et al., 1954)

Das ADLER' sche Medium wird am Lehrstuhl für Krankheiten d. Hausgeflügel, Zier- und Zoovögel der Universität München seit langem verwendet.

Mycoplasmen sind aufgrund ihrer Morphologie und Stoffwechseleigenschaften gegenüber einer Reihe von Antibiotica natürlich resistent. Neben Penicillin gehören dazu die Cephalosporine, Bacitracin, Cycloserin, die Polymyxine

und Sulfonamide (SCHÜTZE, 1968) .

Über den Wirkungsmodus der Antibiotica bei Mycoplasmen ist bis heute noch sehr wenig bekannt. Untersucht ist bis jetzt nur die Wirkung von Chloramphenicol, Erythromycin, Streptomycin und Tetracyclin auf Mycoplasmen.

Nach VASQUEZ & MONRO (1967) soll durch Chloramphenicol eine Hemmung der Proteinsynthese infolge Bindung des Antibioticums an die Ribosomen eintreten. Diese Hemmung der Proteinsynthese wird jedoch nur in Organismen vollzogen, die 70 s Ribosomen haben (Bakterien, Mycoplasmen, grün- blaue Algen). Die Proteinsynthese in Hefen, Protozoen und Mehrzellern, die 80 s Ribosomen haben, wird nicht unterbrochen. Die Macrolidantibiotica, zum Beispiel Erythromycin, reagieren nach diesen Autoren ebenfalls spezifisch mit den 70 s Ribosomen und nicht mit den 80 s Ribosomen. Von Verbindungen, die die Proteinsynthese nur am 80 s Ribosom unterbrechen und nicht am 70 s Ribosom, wie z.B. Cyclohexamid, ist bei Mycoplasmen keine Proteinsynthesehemmung zu erwarten. Die Ribosomen gelten zwar als Reaktionsort, doch ist die eigentliche Interaktion noch unbekannt.

TOURTELLOTTE (1969) bestätigt aufgrund eigener Untersuchungen mit Mycoplasmenstämmen (*M. gallisepticum*, *A. laidlawii*, *M. hominis*, *M. agalactiae*, *M. pneumoniae*) , daß die Proteinsynthese der Antibiotica an den 70 s Ribosomen unterbrochen wird.

Im Gegensatz dazu sind SCHWARZ & PERLMAN (1971) der Auffassung, daß die Resistenz gegenüber Chloramphenicol,

Streptomycin und Tetracyclin in jedem Fall auf einer reduzierten Permeabilität der Zellmembran gegenüber den Antibiotica beruht. Die Membran reguliert die Antibioticaaufnahme. Die Menge des Antibioticums, die benötigt wird, um Mycoplasmen abzutöten, ist höher als für Bakterien. Nach den angeführten Autoren dürfte die Resistenz nicht durch die Veränderung der ribosomalen Proteine verschiedener Mycoplasmenarten bedingt sein.

Zur Therapie der verschiedenen Mycoplasmosen des Geflügels werden nachfolgend kurz beschriebene Antibiotica empfohlen.

Das aus *Streptomyces erythreus* gewonnene ERYTHROMYCIN (McGUIRE et al., 1952) wirkt insbesondere auf grampositive Bakterien und Mycoplasmen (BRANDNER & PUGH, 1971) . Das Wirkungsoptimum liegt bei pH 8 - 8,5. Bei pH 7 sind 4-fach höhere Konzentrationen zur Erzielung einer gleichen Wirkung notwendig (WALTER & HEILMEYER, 1969) . LAI (1970) erklärt Therapieversager durch fehlerhafte Dosierung. Es sind zur Erzielung therapeutischer Blutspiegel 100 mg/ kg Kgw nötig. Die von früheren Autoren verwendeten Dosen von 25 mg/ kg Kgw. bringen keine ausreichenden Blutspiegel. BARNES et al. (1960 c) berichten über eine schnelle Resistenzsteigerung unter Erythromycinanwendung bei Mycoplasmen. Die in der Literatur angegebenen MIC für Erythromycin schwanken zwischen 0,004 und 100 mcg/ml (siehe Tabellen 2, 3a, 3b, 4a, 4b) .

Das Wirkungsspektrum des aus *Streptomyces ambofaciens* gewonnenen SPIRAMYCINS entspricht dem anderer Macrolide

(PINNERT - SINDICO et al., 1954/ 55; BRUNNER & MACHEK, 1965) . Die im Vergleich zu Erythromycin besseren in-vivo Ergebnisse trotz ungünstiger in-vitro Effektivität sind nach INGLIS & JONES (1966) durch eine höhere Gewebsaffinität zu erklären. Auch für Spiramycin liegt das pH-Optimum bei pH 8 (WALTER & HEILMEYER, 1969) . Bei *M. gallisepticum* Feldstämmen haben KISER et al. (1961) Resistenzen gegenüber Spiramycin im Hühnerembryonenschutztest festgestellt. KUNIYASU et al. (1974) berichten über das gleichzeitige Bestehen von Resistenzen gegen Spiramycin und Tylosin bei japanischen *M. gallisepticum* Stämmen. Die Hemmwerte für Spiramycin liegen zwischen 0,1 und 8,0 mcg/ml (siehe auch Tabelle 2, 3a, 3b, 4a, 4b) .

Das aus *Streptomyces fradiae* gewonnene TYLOSIN gilt als Spezifikum gegen Mycoplasmose, besonders der des Geflügels (BRANDNER & PUGH, 1971) . Das Wirkungsoptimum von Tylosin liegt bei pH 7,5. GOREN (1972) fand eine Kreuzresistenz bei 2 *M. gallisepticum*- und 1 *M. synoviae*- Stamm zwischen Tylosin und Spectinomycin. Ein gleichzeitiges Bestehen von Resistenzen gegen Tylosin und Spiramycin fanden KUNIYASU et al. (1974) bei japanischen *M. gallisepticum* Stämmen. Die in-vitro Hemmwerte für Tylosin liegen zwischen 0,0031 - 1,0 mcg /ml (siehe auch Tabelle 2, 3a, 3b, 4a, 4b) .

Zur TETRACYCLIN - Gruppe gehören Tetracyclin, Oxytetracyclin, Roli-Tetracyclin, Chlortetracyclin, Demethylchlortetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin (WALTER & HEILMEYER, 1969) . In der Tiermedizin werden hauptsächlich Chlortetracyclin und Oxytetracyclin verwendet (ZANELLA & MAZZARRI, 1966) . Sämtliche Tetracyclinderivate sind untereinander kreuzresistent (WALTER & HEILMEYER, 1969) . Das pH- Optimum liegt bei 6,1 - 6,6. Die in-vitro erreichten Hemmwerte lassen eine gute in-vivo Wirksamkeit gegen Mycoplasmen erwarten. Die MIC liegen bei Tetracyclin zwischen 0,1 - 10 mcg/ml, für Oxytetracyclin bei 0,02 - 10 mcg/ml und bei Chlortetracyclin ebenfalls zwischen 0,02 und 10 mcg/ml (weitere Angaben in den Tabellen 2, 3a, 3b, 4a, 4b) . Doch ist diese Wirkung von Tetracyclinen in-vivo stark umstritten. WHITEHILL & KISER (1961) und HAMDY et al. (1957) berichten über gute klinische Erfolge bei der sogenannten CRD des Geflügels, während NEMTEANU et al. (1966) zwar eine klinische Besserung bestätigen, aber darauf hinweisen, daß die Luftsackkläsionen nur unvollständig ausheilen und die Erreger noch in großer Zahl rückisolierbar sind (YAMAMOTO et al., 1966; SHARP, 1970) . OLESIUK et al. (1964) ermittelten durch in-vivo Versuche mit *M. gallisepticum*- Stämmen, daß Chlortetracyclin und die Mischung aus Chlortetracyclin und Oxytetracyclin dem Oxytetracyclin alleine überlegen sind.

Bei SPECTINOMYCIN handelt es sich um ein Aminoglycosid-antibioticum, das aus Kulturfiltraten von *Streptomyces flavopersicus* und *Streptomyces spectabilis* gewonnen wird

(WALTER & HEILMEYER, 1969) . Das pH- Optimum liegt bei pH 7,9 - 8,4 (LEWIS et al., 1961) . Wie Spiramycin besitzt auch Spectinomycin eine hohe Gewebsaffinität (ZOLLI & MUTH, 1967) . GOREN (1972) berichtet über Kreuzresistenzen zwischen Spectinomycin und Tylosin bei aviären Mycoplasma-Stämmen. Bei den gleichen Species soll Spectinomycin und Lincomycin im Verhältnis 2-6 : 1 synergistisch wirken (HAMDY & BLANCHARD, 1970) . Die Autoren geben unterschiedliche Hemmwerte an. Sie schwanken zwischen 1,0 und 20 mcg/ml (siehe Tabellen 2, 3a, 3b, 4a, 4b) .

LINCOMYCIN aus der Gruppe der Carbohydrate wird aus *Streptomyces lincolnensis* gewonnen. Das Wirkungsspektrum ist dem der Macrolidantibiotica vergleichbar. Sein pH-Optimum liegt bei pH 8 - 8,5 . Bei pH 7 sind wie bei Erythromycin in-vitro 4- fach höhere Hemmkonzentrationen erforderlich (WALTER & HEILMEYER, 1969) . Zwischen Lincomycin und Erythromycin soll nach GRIFFITH et al. (1965) ein Antagonismus bei menschlichen Mycoplasma-species bestehen. HAMDY & BLANCHARD (1970) fanden einen Synergismus zwischen Lincomycin und Spectinomycin gegen aviäre Mycoplasmen. Sie empfehlen eine Kombination der Wirkstoffe im Verhältnis 1 : 2-6 bei der Therapie von Mycoplasmosen des Geflügels. HEIN (1974) erwähnt eine Kreuzresistenz gegenüber Macrolidantibiotica. Die MIC von Lincomycin schwanken zwischen 0,004 und 8 mcg/ml (siehe auch Tabellen 3b und 4b) .

Das Präparat 81.723 hfu ist ein Derivat des seit langem bekannten Antibioticums Pleuromutilin. Es befindet sich derzeit noch nicht im Handel. Es ist vorwiegend wirksam gegen grampositive Bakterien und Mycoplasmen und besitzt seine größte Aktivität in schwach alkalischem Milieu (DREWS et al., 1975) .

Derselbe Autor beobachtet eine sehr hohe Empfindlichkeit in-vitro bei *M. gallisepticum*-Stämmen. In-vivo Versuche zeigen eine Effektivität, die mit dem Tylosin durchaus vergleichbar ist (unveröffentlichte Institutsuntersuchungen) .

Der in-vitro Test zur Bestimmung der MIC (minimum inhibition concentration) erfolgt in der Regel im Reihenverdünnungstest. Dieser arbeitet nach folgendem Prinzip: Röhrchen mit einem für die betreffende Keimgruppe optimalen Nährmedium, in dem abgestufte Wirkstoffmengen enthalten sind, werden mit dem zu prüfenden Keim beimpft. In der Regel wird ein Wachstumsindikator (meist pH- Indikator und Glucose) beigefügt. Nach entsprechender Bebrütungszeit werden die Röhrchen abgelesen. Die niedrigste Konzentration des Wirkstoffs, bei der gerade noch Wachstum möglich ist, wird MIC genannt (HALLMANN & BUNKHARDT, 1974; SCHÜTZE, 1968) .

Dieser Test, dessen Prinzip außerordentlich einfach ist, wird von einer Reihe Faktoren **in** verschieden starkem Ausmaß beeinflusst.

Einfluß der Einsaatmenge:

In der Bakteriologie gilt es als Regel, Keimeinsaat unter 10^6 Keimen/ml Medium zu wählen. Als Begründung wird angegeben, daß bei höheren Einsaaten die Zahl der Wirkstoffmoleküle im Nährmedium nicht mehr ausreicht, um die Zelloberfläche wirkungsvoll zu besetzen. Die nicht ausreichend an ihrer Oberfläche mit Wirkstoffmolekülen besetzten Keime vermehren sich ungehemmt und täuschen so eine Wirkungslosigkeit der betreffenden Wirkstoffkonzentration vor (MEYNELL & MEYNELL, 1970) .

Bei Mycoplasmen ist wahrscheinlich wegen der Kleinheit der Zellen der Einfluß der Einsaatmenge nicht so stark wie in der Bakteriologie. Jedoch sollten Keimzahlen von mehr als 10^8 Keimen/ml Medium vermieden werden (MEJNIKOV & RAKOVSKAYA, 1969) . Bei langsam wachsenden Keimen spielt die Einsaatmenge auch insofern eine Rolle, da es mit der Zeit zu einer Anreicherung von unerwünschten Stoffwechselprodukten kommt und zusätzlich das Flüssigmedium verdunstet (SMITH, 1971 a; RODWELL, 1969) .

Einfluß des Wirkungsoptimums:

Es wird nur in einem Teil der Fälle möglich sein, einen pH- Wert einzustellen, der gleichzeitig ein optimales Keimwachstum und einen optimalen Wirkungseffekt des Antibiotikums gestattet, weil diese Werte selten identisch sind. Aber auch im Organismus findet man solche optimalen pH- Werte selten vor. Der pH-Wert für optimales Keimwachstum muß in diesem Test den Vorrang erhalten, da bei suboptimalen pH-Werten bereits eine Wachstums-

hemmung auftritt. Das bedeutet, daß je nach den Umständen des Einzel falls in-vitro eine zu gute oder eine zu schlechte Wirksamkeit vorgetäuscht wird (BUTLER & KNIGHT, 1960; SMITH, 1971 b; GERLACH, 1968) .

Einfluß der Stabilität des Wirkstoffs:

Bei langsam wachsenden Keimen spielt die Stabilität des Wirkstoffs im Nährmedium bei 37°C eine erhebliche Rolle für die Ermittlung der MIC. Bei instabilen Wirkstoffen, wie zum Beispiel Tetracyclin, kommt man infolge Abfall der Aktivität zu falsch hohen MIC (NEWNHAM & CHU, 1965).

Einfluß der Entwicklungsphase der Keime:

In einer Kultur kommen die Einzelorganismen gleichzeitig in der Ruhe- , Wachstums- oder Vermehrungsphase vor (MELNIKOV & RAKOVSKAYA, 1969) . Es erscheint wünschenswert, daß für eine solche Resistenztestung die Keime in einer annähernd gleichen Phase vorliegen. In der Bakteriologie verwendet man dazu log-phase Kulturen (MEYNELL & MEYNELL, 1970) . Bei langsam wachsenden Keimen ist die log-phase nicht immer ohne Schwierigkeiten zu ermitteln, weshalb man in diesem Fall eine Synchronisation der Keime versucht. Bei den Geflügelmycoplasmen scheint eine 12 - 24 h Aufbewahrung im Kühlschrank bei +4 °C für diesen Zweck zu genügen. Die Keime gehen in eine Ruhephase über oder sterben ab. Der Keimtiter sinkt ab (SMITH, 1971 b) .

Einfluß der Gewebsaffinität des Wirkstoffes:

Eine Testung von Substanzen, die eine starke Gewebsaffinität besitzen, ist in vitro nur bedingt möglich. Die im Röhrchen festgestellte MIC kann lediglich einen Anhaltspunkt dafür bieten, ob der Keim in-vitro empfindlich ist oder nicht. Es gibt derzeit kaum eine in-vitro Methode, um Gewebsaffinitäten zu simulieren (INGLIS & COOK, 1964).

Röhrchenverdünnungsteste mit Mycoplasmen werden in der Regel mit Glucose oder Arginin, sowie Phenolrot als Indikator angesetzt und beim Farbumschlag des Röhrchens ohne Wirkstoff, das als Wachstumskontrolle dient, unmittelbar abgelesen (NEWNHAM & CHU, 1965; GROSS, 1961; BETTENCOURT, 1966). Bei diesem Ablesemodus kommt man zu sehr niedrigen MIC's, die sich im Tierversuch nicht mehr bestätigen lassen (GERLACH, 1968). Als mögliche Fehlerquellen kommen in Betracht:

Nach FRIEDRICHS (1970) können bei Mycoplasmen Stoffwechseleigenschaften durch Antibiotica gehemmt werden, während Wachstumseigenschaften ungehemmt bleiben. So können hohe Empfindlichkeiten vorgetäuscht werden.

ZAVADOVA-SUCHANOVA & RYC (1968) berichten von einer lag-phase Verlängerung in Nährböden mit Penicillinzusatz bei menschlichen Mycoplasma-Stämmen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen HOTTLE & WRIGHT (1966) bei murinen Mycoplasma-Stämmen.

Die sofortige Ablesung des Testes bei positiver Wachstums-
kontrolle ergibt eine zu niedrige MIC. Da Mycoplasmen,
wie schon erwähnt, gegen Penicillin natürlich resistent
sind, ist als Grund der lag-phase Verschiebung die Än-
derung des Wachstumsmilieus anzusehen. Es ist zu erwarten,
daß eine solche Verschiebung auch bei der Verwendung an-
derer Antibiotica auftreten kann (ZAVADOVA-SUCHANOVA &
RYC, 1968) .

Die vielen Einzelberichte, in denen die MIC verschiedener
Antibiotica für eine Reihe von aviären Mycoplasma - Stämmen
ermittelt wurde , sind in den Tabellen 2, 3a, 3b, 4a,
4b zusammengefaßt.

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Versuchsplan

Im Reihenverdünnungstest in Röhrchen wurde die MIC für 7 verschiedene Antibiotica bei 5 aviären Mycoplasma - Stämmen bestimmt.

Zur Feststellung einer eventuellen lag-phase Verkürzung oder Verlängerung, einer Generationszeitverkürzung oder Verlängerung, oder eines Keimtiterabfalles, wurden diese Stämme mit und ohne Anwesenheit von subletalen Dosen der getesteten Antibiotica in bestimmten Zeitabständen titriert und die Ergebnisse ausgewertet.

2. Material und Methoden

Verwendete Stämme

- M. gallisepticum S₆ 208 von Dr. Adler, Laborstamm.
- M. gallisepticum 699 von Dr. Zolli jr., Laborstamm.
- M. anatis von Dr. Roberts, Laborstamm.
- TU - Stamm von Dr. Adler, Serotyp C, Laborstamm.
- 834/71 Feldstamm, Serotyp I, Putenisolat Oberschleißheim.

Alle Stämme, außer dem TU - Stamm sind pathogen. Als Hauptenergiequelle wurde Glucose verwendet. Für den Serotyp I - Stamm wurde wegen des besseren Wachstums Argininzusatz gewählt.

Stammhaltung

Die Aufbewahrung der Teststämme erfolgte im Brutschrank bei 37°C in Overlay - Röhrrchen nach ADLER (siehe später) . Sie wurden in der Regel alle 14 d auf frische Röhrrchen überimpft. Zur Kontrolle wurden sie alle 1/2 Jahre auf ihre Stoffwechsel- und serologischen Eigenschaften geprüft. Zu den Versuchen wurden nur Stämme verwendet, deren Keimzahl in 72 h auf mehr als 10^{10} - 10^{11} Keime/ml Medium anstieg. Bei niedrigen Keimzahlen wurde zunächst das Wachstum durch schnelle Passagen angeregt.

Medien

Overlay - Röhrrchen nach ADLER (Rezept 1)

Difco- PPLO Agar	21,0 g
Hefeautolysat	55,0 ml
Thalliumacetat 10% ig	5,0 ml
Aqua bidest.	ad 1.000,0 ml

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 56°C erfolgte die Zugabe von 1.000 i.E. Penicillin- G/ ml Medium und von 100 ml sterilen, inaktivierten Pferdeserums.

Aus dem Agar wurden kurze Schrägröhrrchen gegossen, 24 h stehengelassen und dann mit 7 ml PPLO - Broth (siehe Rezeptur 2) überschichtet. Zur Herstellung von PPLO - Agar Platten wurde oben beschriebener PPLO - Agar in Platten gegossen.

Herstellung des Hefeautolysats

120 g Bäckerhefe wurden in 200 ml Aqua bidest. suspendiert

und im verschlossenen Glaskolben im Wasserbad bei 56°C 48 h unter gelegentlichem Schütteln autolysiert. Nach Zentrifugation (12.000 Upm, 20 min.) wurde der Überstand klarfiltriert (Seitz K-7 Filter) und im Gefrierschrank bei - 20°C aufbewahrt.

Herstellung des Pferdeserums

Pferdeserum wurde durch Seitz K-7 Filter klarfiltriert und anschließend durch Seitz EKS-2 Filter sterilfiltriert. Danach wurde es bei 56°C im Wasserbad inaktiviert und im Gefrierschrank bei Temperaturen von - 20°C aufbewahrt.

Herstellung der PPLO- Broth für den Reihenverdünnungstest (Rezept 2)

Difco PPLO Broth w/o CV	21,0 g
Glucose oder Arginin	10,0 g
Thalliumacetat 10 % ig	5,0 ml
Hefeautolysat	55,0 ml
Phenolrot	30 mg
Pferdeserum steril, inaktiviert	100,0 ml
Aqua bidest.	ad 1.000,0 ml
Penicillin - G	1.000.000 i.E.

Nach der Sterilisation im Autoklaven und Abkühlung auf unter 56°C wurden die oben erwähnten 100 ml Pferdeserum und 1.000.000 i.E. Penicillin zugesetzt. Der pH-Wert des Fertigmediums betrug pH 7,6 . Lag der Wert darunter, so wurde er durch Zugabe von steriler NaOH eingestellt. Dies geschah vor allem, um die Farbtintensität des Phenolrot-indikators zu erhöhen.

3. MIC - Bestimmung

Die Bestimmung der MIC erfolgte im R hrchenverdünnungstest mit fallenden Konzentrationen (2-er Logarithmusreihe) der zu prüfenden Substanzen im oben beschriebenen Medium (Rezept 2) . Als Inoculum dienten 0,1 ml einer Mycoplasmenflüssigkultur, die 48 h bebrütet worden war. Die durchschnittliche Keimzahl betrug 10^6 Keime / Röhrchen. Eine Wachstumskontrolle ohne Antibioticum wurde jedesmal mitgeführt. Im Flüssigmedium wurde das Keimwachstum infolge Glucoseverg rung und pH-Verschiebung zum sauren Bereich durch Farbumschlag des Indikators von rot nach gelb (entsprechend stärkere Rotfärbung bei Arginin) angezeigt .

Abgelesen wurde nach 48, 72 und 96 h . Die Röhrchen, die keinen Farbumschlag zeigten, wurden auf PPLO - Platten ausgestrichen und 7 d in einer feuchten Kammer bebrütet. Die MIC wurde aufgrund des Farbumschlages und der mikroskopischen Untersuchung der Platte auf Koloniewachstum ermittelt (siehe dazu Tabelle 5) .

Herstellung der Antibiotical sungen

Von allen verwendeten Antibiotica wurde zunächst eine Stammlösung von 2 mcg/ml hergestellt. Von dieser wurde über Verdünnungsschritte die Endkonzentration eingestellt. Für die Untersuchung wurden Konzentrationen verwendet, die niedriger lagen als die im Vorversuch ermittelte MIC (siehe Tabelle 6) . Die Konzentration des Wirkstoffes

unterhalb der MIC erwies sich als notwendig für die Gewährleistung eines Stammwachstums, das eine Testablesung noch zuließ.

Folgende Antibiotica wurden verwendet:

- Tylosintartrat (1)
- Erythromycin - glucoheptonat (2)
- Spiramycinbase (3)
- Oxytetracyclinhydrochlorid (4)
- Spectinomycin-dihydrochlorid-pentahydrat-salz (5)
- Lincomycin-hydrochlorid-monohydrat (6)
- 81.723 hfu : 14-deoxy-14-((2-diethylaminoethyl)-mercapto-acetoxy)-mutilin (7)

-
- 1 Elanco - T^R soluble der Fa. Eli Lilly, Bad Homburg
 - 2 Erycinum^R - Testampulle der Fa. Schering, Berlin
 - 3 Suanovil^R pro inj. der Fa. S.P.E.C.I.A., Paris
 - 4 Terramycin^R der Fa. Pfizer, Karlsruhe
 - 5 Spectam^R der Fa. Abbott, Bad Segeberg
 - 6 Albiotic^R der Fa. Upjohn, Heppenheim/ Bergstraße
 - 7 81.723 hfu Versuchspräparat der Fa. Sandoz, Wien
als 10 % ige Lösung

Synchronisation der Kultur

Die Versuchsstämme wurden 12 - 24 h vor dem unten beschriebenen Versuch im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Kontrolltitrationen zeigten nach dieser Zeit einen leichten Titerabfall von 90 - 99 % . Zur weiteren Standardisierung wurden die Röhrchen für die Titration bei Zimmertemperatur aufbewahrt, die Kolben mit der Antibioticaverdünnung bereits vor der Keiminoculation auf 37°C erwärmt, die Antibioticaverdünnungslösungen auf 4°C gehalten.

4. Bestimmung von lag-phase und Keimtiteranstieg

Für den Versuch wurden das Antibioticum in der gewählten Konzentration in 100 ml Medium (Rezept 2) eingebracht und mit dem betreffenden Mycoplasma - Stamm inoculiert. Die Suspension wurde anschließend sofort titriert. Da eine Mycoplasmentitration in der Regel 10 d dauert, und in dieser Zeit jede Kultur im Titer abnimmt, wurden die Hauptversuche immer erst nach dem Ansatz titriert. Die Kultur mit Antibioticum und die Wachstumskontrolle wurden zur Feststellung der Dauer der lag-phase und einer möglichen Titerverminderung durch das Antibioticum in der 1., 4., 5., 6., 7., 8. und 10. h des Versuches titriert. Die Titration erfolgte in einer 2er Logarithmusreihe im gleichen Medium, um Umwelteinflüsse weitgehend auszuschalten. Die Ablesung der Röhrchen geschah nicht nur nach dem Farbumschlag, sondern rot gebliebene, also vermeintlich nicht gewachsene Röhrchen wurden auf PPLO - Agar ausgestrichen und wie bereits be-

schrieben, weiterverarbeitet. Alle Versuche wurden mit antibioticafreier Wachstumskontrolle angesetzt.

5. Auswertung

Die Wachstumsergebnisse des betreffenden Stammes mit und ohne Antibioticum wurden graphisch dargestellt, wobei zur Verbesserung der Übersichtlichkeit auch mit Mittelwertdarstellungen gearbeitet wurde.

Eine Abschätzung der Fehlergrenze bei der Keimzählung ergab $\pm$ eine 2-er Potenz.

D ERGEBNISSE

Reproduzierbare Ergebnisse wurden nur erreicht, wenn die Ausgangskulturen ein schnelles Wachstum zeigten und wenn vor dem Kulturansatz mit den subletalen Antibioticadosen eine Synchronisation der Kulturen stattfand. Da die Keimeinsaat des Versuchsansatzes, wie bei der Methodik besprochen, immer nur gleichzeitig mit dem Kulturansatz titriert wurde, war ein großer Teil der Versuche wegen zu geringer Keimeinsaat nicht auswertbar.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt (siehe auch Tab.: 7, 8):

M. gallisepticum S₆ 208 und 699

Beide Stämme verhielten sich relativ einheitlich. Der Beginn der exponentiellen Wachstumsphase lag zwischen der 5. und 6. h nach der Inoculation. Bei 2 Versuchen begann das logarithmische Wachstum bereits nach der 4. h. Die in den Versuchen gewählten Antibiotikakonzentrationen bewegten sich zwischen 10 % und 50 % der MIC (siehe Tabelle 6) .

Tylosin bewirkte in der Regel eine gegenüber der Wachstumskontrolle deutlich verkürzte lag-phase. Der Keimzahlanstieg erreichte nur einmal die Werte der Kontrolle. Den höchsten Keimzahlwerten folgte ein deutlich abfallender Titer (Abbildung 10, 14, 15) .

Durch die Einwirkung von Erythromycin wurde die lag-phase nur unwesentlich verkürzt, der Keimtiter lag deutlich unter dem der Wachstumskontrolle (Abb.: 9, 15) .

Die durch Spiramycin beeinflusste lag-phase war ebenfalls gegenüber der Wachstumskontrolle verkürzt. Es kam zu einem Keimzahlanstieg, der durchschnittlich die Kontrollwerte erreichte (Abb.: 10, 14, 15) . Nur bei einem Versuch (Abb.: 14) kam es zu einem vorübergehenden Keimzahlabfall, der aber noch vor Versuchsende wieder ausgeglichen wurde.

Die verwendeten Stämme von *M. gallisepticum* zeigten unter Oxytetracyclinwirkung eine mit der Kontrolle einhergehende (Abb.: 11) und eine verlängerte lag-phase (Abb.: 9, 15) . Die Keimzahlen der Wachstumskontrolle wurden in keinem Fall erreicht. Nach der exponentiellen Wachstumsphase folgte unverzüglich, ohne deutliche stationäre Phase, eine Keimzahlabnahme.

Unter dem Einfluß von Spectinomycin (Abb.: 11, 14, 15) wurde die lag-phase um 1 h verlängert. Die Keimzahlen der Wachstumskontrolle wurden in keinem Fall erreicht. (Abb.: 14).

Bei Lincomycin wurde die lag-phase um 1-3 h verlängert. Die Keimzahlen der Wachstumskontrolle wurden bis auf einen Versuch mit *M. gallisepticum* S₆ 208 (Abb.: 16a) , erreicht (Abb.: 9, 16) .

81.723 hfu verlängerte die lag-phase um durchschnittlich 2 h (Abb.: 12) . Der Keimzahlanstieg verlief parallel zu den Kontrollwerten, fiel aber zu Versuchsende deutlich unter diese Werte.

M. anatis

Durchschnittlich wurde der Beginn der exponentiellen Wachstumsphase zwischen der 4. und 6. h beobachtet. Die gewählten Antibioticakonzentrationen lagen ungefähr bei 10 % - 50% der MIC (siehe Tabelle 6) .

Durch den Einfluß von Tylosin wurde die lag-phase deutlich verkürzt, der Keimzahlanstieg erreichte nicht die Kontrollwerte. Schon während der exponentiellen Wachstumsphase der Kontrolle kam es zu einem Titerabfall in dem tylosin-haltigen Medium (Abb.: 17) .

Bei Erythromycin wurden während der gesamten Versuchszeit gleichbleibende Keimzahlen gemessen. Der in Abb.: 19 dargestellte Anstieg um eine 2-er Potenz (zwischen 5. und 6. h) , lag im Bereich der Fehlergrenze und kann daher nicht sicher als exponentielle Wachstumsphase angesprochen werden.

Spiramycin verursachte ebenfalls eine Verkürzung der lag-phase um 2 h. Der Kontrolltiter wurde nicht erreicht. Noch vor Versuchsende namen die Keimzahlen ab (Abb.: 19) .

Oxytetracyclin verlängerte die lag-phase um 1 h. Der scheinbare Titerabfall vor der exponentiellen Phase lag noch im Bereich der Fehlergrenze. Der Keimzahlanstieg erreichte das Maximum noch vor den Kontrollwerten und wurde von einem Titerabfall gefolgt (Abb.: 19) .

Spectinomycin bewirkte bei M. anatis eine lag-phase Ver-

längerung um 1 h. Der Titeranstieg erreichte die Kontrollwerte (Abb.: 19) .

Unter der Einwirkung von Lincomycin (Abb.: 17) zeigte sich andeutungsweise eine exponentielle Wachstumsphase erst zum Versuchsende.

Bei 81.723 hfu verlängerte sich die lag-phase um 2 h. Der nachfolgende Titeranstieg lag höher als die Kontrollwerte (Abb.: 18) .

TU-Stamm

Die unbeeinflusste lag-phase dauerte 6 - 7 h. Die verwendeten Antibiotikakonzentrationen lagen 20 % - 60 % unter der MIC (siehe Tabelle 6) .

Durch Tylosin wurde die lag-phase um 2 h verkürzt. Der sich an die exponentielle Phase anschließende, scheinbare Titerabfall lag noch im Bereich der Fehlergrenze. Die Keimzahlwerte bewegten sich deutlich unter den Maximalwerten der Kontrolle (Abb.: 20) .

Unter Erythromycinwirkung verkürzte sich die lag-phase um 1 h. Der weitere Verlauf der Keimvermehrung entsprach der des Tylosins (Abb.: 20) .

Auch Spiramycin bewirkte eine lag-phase Verkürzung um 2 h. Der Titeranstieg während der exponentiellen Wachstumsphase überstieg zwar den des Tylosins, bewegte sich aber noch unter den Maximalwerten der Wachstumskontrolle (Abb.: 20).

Mit Oxytetracyclin im Medium vermehrte sich der TU-Stamm nur unwesentlich. Die Keimzahl blieb während der gesamten Versuchsdauer, unter Berücksichtigung der Fehlergrenze der Methodik, gleich (Abb.: 20) .

Durch Lincomycin wurde die lag-phase um 1 h verlängert. Die maximalen Keimzahlen lagen deutlich unterhalb den Kontrollwerten (Abb.: 21 a) .

Stamm 834/71

Die lag-phase der Wachstumskontrolle dauerte 6 h. Die gewählten Antibiotikakonzentrationen lagen zwischen 10 % und 60 % der MIC (siehe Tabelle 6) .

Unter dem Einfluß des Tylosins blieben die Keimzahlen während des Versuches annähernd unverändert. Der scheinbare Titerabfall während der 1. und 4. h und der Wiederanstieg zwischen der 6. und 7. h lag im Bereich der Fehlergrenze der Methodik (Abb.: 22) .

Die Wirkung des Erythromycins war mit der des Tylosins vergleichbar.

Spiramycin bewirkte eine lag-phase Verkürzung um 2 h. Die beiden Titer (Kontrolle) erreichten die gleiche Höhe. Im spiramycinhaltigen Medium schloß sich jedoch ein Titerabfall bis auf Ausgangswerte an (Abb.: 22) .

Durch Spectinomycin kam es zu einem scheinbaren Keimzahlabfall während der um 1 h verlängerten lag-phase. Diese

Werte lagen noch innerhalb der Fehlergrenze. Der nachfolgende Keimtiteranstieg erreichte fast die Kontrollwerte (Abb.: 22) .

Durch Oxytetracyclin wurde die lag-phase um 2 h verkürzt, der exponentielle Keimtiteranstieg erreichte fast die Kontrollwerte (Abb.: 22) .

Betrachtet man vergleichend die Wirkung ein und desselben Antibioticums auf verschiedene Mycoplasma - Species, so ergibt sich folgendes Bild:

Tylosin (Abb.: 23 a, 23 b)

Die lag-phase wurde durch diese Substanz bei allen Species verkürzt, im Durchschnitt um 1 - 2 h. Die maximalen Keimzahlen der Wachstumskontrolle wurden nicht erreicht, vielmehr gingen die Keimzahlen noch vor Versuchsende annähernd auf die Ausgangswerte zurück.

Erythromycin (Abb.: 24)

Die Mittelwertdarstellung von Erythromycin zeigte bei allen Versuchen einen Keimzahlanstieg mit einer lag-phase Verkürzung von 1 h. Obwohl dieser vorzeitige Anstieg noch im Bereich der Fehlergrenze lag, kann man, im Ganzen gesehen, annehmen, daß er tatsächlich vorhanden war. Die stationäre Phase war, mit Ausnahme von einem Versuch mit *M. gallisepticum* 699, bereits vor Beendigung der Versuchszeit abgelaufen.

Spiramycin (Abb.: 24)

Diese Substanz bewirkte ebenfalls eine Verkürzung der lag-phase bei allen getesteten Stämmen. Die Kontrollwerte wurden von den meisten Stämmen erreicht (M. gallisepticum S₆208, 699 mit einem Versuch, Feldstamm 834/71) . Bei der Darstellung des Stammes M. anatis liegen dessen Werte deshalb scheinbar über dem der Kontrolle, da dieser Stamm im Versuch ein sehr starkes Keimwachstum zeigte, die Darstellung der Kontrolle jedoch einen Mittelwert repräsentiert . In Wirklichkeit erreichte dieser Stamm die Maximalwerte der Wachstumskontrolle nicht. Ähnlich verhielt es sich mit den oben angegebenen Stämmen, deren Keimwachstum im Versuch zwar die Kontrollwerte erreichte, bei der Mittelwertsdarstellung infolge wenig ausgeprägtem exponentiellen Keimwachstum unterhalb der Mittelwertkontrolle blieben.

Oxytetracyclin (Abb.: 28)

Das Oxytetracyclin zeigte ein außerordentlich ungleiches Bild. Bei den einzelnen Species war die Wirkung unterschiedlich, bei M. gallisepticum auch innerhalb einer Species. Es trat sowohl eine lag-phase Verkürzung (M. gallisepticum 699, TU-Stamm, 834/71) , ein mit der lag-phase der Kontrolle einhergehendes Wachstum (M. gallisepticum S₆208 bei einem Versuch) , als auch eine lag-phase Verlängerung auf (M. gallisepticum S₆208 in einem anderen Versuch, M. anatis) . Bis auf einen Fall (M. gallisepticum S₆208) zeigten die Keimzahlen nach der exponentiellen

Phase eine fallende Tendenz.

Spectinomycin (Abb.: 26)

Durch Spectinomycin wurde die lag-phase generell um ca. 1 h verlängert. Die Keimzahlen der Kontrolle wurden nicht erreicht. In der Darstellung der Stämme *M. anatis* und *M. gallisepticum* S₆ 208 lagen die Werte der Versuchsansätze deshalb scheinbar über denen der Kontrolle, da in diesen beiden Versuchen die Keimzahlen der Wachstumskontrolle extrem hoch lagen, die Darstellung der Kontrolle jedoch einen Mittelwert aus allen Versuchen repräsentiert. In Wirklichkeit wurden die Kontrollwerte nicht überschritten.

Lincomycin (Abb.: 27)

Dieses Antibioticum bewirkte bei allen getesteten Stämmen eine lag-phase Verlängerung zwischen 1 und 3 h. Bei einem Versuch mit dem Stamm *M. gallisepticum* S₆ 208 und bei dem Stamm 699 wurden die Werte der Wachstumskontrolle erreicht. Die anderen getesteten Stämme lagen deutlich unter der Wachstumskontrolle.

81.723 hf (Abb.: 29)

Unter dem Einfluß dieser Substanz kam es bei allen getesteten Stämmen zu einer deutlichen lag-phase Verlängerung. Der Keimzahlanstieg erreichte bei *M. gallisepticum* S₆ 208 die Werte der Kontrolle, bei *M. anatis* überstieg er diese sogar. Nur bei *M. gallisepticum* S₆ 208 sank der

Keimtiter noch innerhalb der Versuchszeit auf Ausgangswerte ab.

E. DISKUSSION

Durch die vorgelegten Untersuchungen wird ermittelt, daß aviäre Mycoplasma - Stämme in vitro durch subletale Antibiotica-dosen im Nährmedium auf 5 verschiedene Arten beeinflusst werden können.

- Lag-phase Verkürzung mit nachfolgendem, im Vergleich zur Wachstumskontrolle geringem Keimzahlanstieg (Tylosintyp) , bei Tylosin (Abb.: 23 a, 23 b) , Erythromycin (Abb.: 25) und bei einzelnen Stämmen mit Oxytetracyclin (ein Versuch mit *M. gallisepticum* 699 - Unterschiede innerhalb eines Stammes - , Feldstamm 834/71 und TU-Stamm) , (Abb.: 28).
- Lag-phase Verkürzung mit anschließendem Keimtiteranstieg bis auf Werte der Wachstumskontrolle und folgendem Titerabfall bei Spiramycin (Abb.: 24) .
- Lag-phase wie bei der Wachstumskontrolle mit nachfolgendem geringem Keimzahlanstieg bei Oxytetracyclin (ein Versuch mit *M. gallisepticum* S₆ 208), (Abb.: 28).
- Lag-phase Verlängerung mit nachfolgendem geringen Keimzahlanstieg bei Lincomycin (außer *M. gallisepticum* S₆ 208 und 699), (Abb.: 27), und Spectinomycin (außer *M. anatis* und *M. gallisepticum* S₆ 208) , (Abb.: 26).

- Lag-phase Verlängerung mit nachfolgendem Keimzahlenanstieg auf Werte der Wachstumskontrolle mit und ohne sich anschließenden Titerabfall bei Lincomycin (Abb.: 27) , Oxytetracyclin mit *M. anatis* (Abb.: 28) , 81.723 hfu (Abb.: 29) Spectinomycin mit *M. anatis* und *M. gallisepticum* S₆ 208 (Abb.: 26) .

Die Versuche haben weiterhin Anhaltspunkte dafür ergeben, daß bei 19 % der Versuche die Generationszeit verlängert ist (Abb.: 14, 15, 22) , während bei *M. anatis* unter Oxytetracyclinwirkung die Generationszeit verkürzt erscheint. (Abb.: 19) .

Die geschilderte Wirkung der Antibiotica auf die betreffenden Mycoplasma - Stämme verursacht, selbst wenn die Maximaltiter der Kontrollen erreicht werden, in allen Fällen eine geringere Keimzahl zu dem Zeitpunkt, bei dem die Wachstumskontrolle aufgrund ihrer unbeeinflussten Stoffwechselaktivität bereits den Farbumschlag zeigt. Bei der Ablesung des Resistenztestes zum Zeitpunkt der Wachstumskontrolle kommt es demnach zu einer falschen Bewertung der augenblicklichen MIC. Für die praktische Durchführung des Reihenverdünnungstests mit Mycoplasmen ergibt sich hieraus die Konsequenz, daß die mitgeführte Kontrolle nichts über den Zeitpunkt aussagt, an dem der Resistenztest abgelesen werden kann.

Ein zweiter wichtiger Punkt erhellt aus folgender Tatsache:

Im Röhrrchenverdünnungstest sind häufig zum Zeitpunkt des Ablesens, wenn nämlich in der Versuchsreihe die ersten Indikatorumschläge auftreten, noch Röhrrchen vorhanden, in denen zwar die Mycoplasmen noch wachsen, deren Stoffwechselaktivität aber nicht mehr ausreicht, um eine pH-Verschiebung zu induzieren. Solche Röhrrchen kann man mit bloßem Auge nicht sicher erkennen, weshalb es unbedingt notwendig ist, das Material der Testreihe bei nicht erfolgtem Indikatorumschlag auf Platten auszustreichen und weiter zu bebrüten. Folglich weichen die mit der hier angewendeten Methode bei Laborstämmen gemessenen MIC's von den in der Literatur angegebenen ab, und zwar sind sie erhöht (Tabelle 2, 3a, 3b, 4a, 4b, 5). Über den Feldstamm des Serotyps I kann in dieser Richtung keine Aussage gemacht werden, weil über ihn keine Literaturangaben vorliegen.

Die für die Ermittlung der lag-phase gewählte Methode führte nur zu einer ausreichenden Reproduzierbarkeit, wenn einige Voraussetzungen erfüllt waren:

Dazu gehört in erster Linie die Synchronisation der Kultur, wie sie auch von MELNIKOV & RAKOVSKAYA (1969) und SMITH (1971b) empfohlen wurde. Mit nicht synchronisierten Kulturen traten in Vorversuchen mit ein und demselben Stamm erhebliche Schwankungen in der lag-phase auf, bzw. diese konnte überhaupt nicht ermittelt werden.

Eine weitere Voraussetzung waren schnell wachsende Ausgangskulturen, da nur dann innerhalb der Versuchszeit von 10 d eine einigermaßen sichere Ablesung möglich war. Die zu den langsam wachsenden Keimen gehörenden Mycoplasmen sind außerordentlich anfällig gegenüber Umweltstörungen und stellen häufig ohne ersichtlichen Grund ihr log-phase Wachstum ein (MELNIKOV & RAKOVSKAYA, 1969) . Nur die schnell wachsenden Ausgangskulturen boten eine gewisse Sicherheit dafür, daß die Testreihen ohne übermäßig große Störungen weiterwuchsen.

Die auswertbaren Versuche, bei denen die oben angegebenen Voraussetzungen erfüllt waren, zeigten eine gute Reproduzierbarkeit, wenn auch im Einzelfall die Keimzahlen unterschiedliche Werte aufwiesen. Die wichtigen Parameter, Dauer der lag-phase, exponentielles Wachstum, Höhe der Maximaltiter zeigten fast in allen Fällen eine einheitliche Tendenz mit Ausnahme von Oxytetracyclin bei *M. gallisepticum* S₆ 208 (Abb.: 28) .

Die Ergebnisse der vorliegenden Analyse des Reihenverdünnungstestes mit Mycoplasmen lassen keine direkte Folgerung auf die in-vivo Wirksamkeit zu.

Es zeigen sich jedoch einige Kurventypen, für die eine in-vivo Wirksamkeit, zumindest für einen Teil der Antibiotica, nachgewiesen ist.

Beim Tylosintyp (Abb.: 23a, 23b, 25) kommt es selbst durch subletale Dosen von Tylosin und Erythromycin, bei einer lag-phase Verkürzung von 1-2 h, nur zu einer unwesentlichen Keimzahlvermehrung. Dies steht zumindest für Tylosin im Einklang mit der in-vivo nachweisbaren guten Wirksamkeit (BARNES et al., 1960 a ; YODER & HOFSTAD, 1965; ZANELLA & MAZZARRI, 1966 ; BRANDER & PUGH, 1971) . Für das Erythromycin ist in der Literatur eine gleich gute Wirksamkeit keinesfalls gesichert. Ein Grund dafür dürften die, in der älteren Literatur verwendeten zu niederen Dosen von 25 mg/kg Kgw. sein (BARNES et al., 1960 c) . Nach LAI (1970) sind mindestens 100 mg/kg Kgw. zur Erreichung eines therapeutisch wirksamen Blutspiegels notwendig.

Der Kurvenverlauf für das Spiramycin (Abb.: 24) ist nicht ganz so eindeutig. Es scheint so, als ob das Spiramycin, gemessen an der Wachstumskontrolle, eine früher einsetzende Wachstumsphase induziert, die sofort, oder nach einer kurzen stationären Phase von einem Titerabfall gefolgt wird (Ausnahme: *M. anatis*) . Die Verkürzung der lag-phase könnte wie beim Tylosin und Erythromycin als eine vorübergehende Aktivierung des Stoffwechsels durch Einwirkung einer Noxe gewertet werden. Der in-vitro Test läßt auch beim Spiramycin auf eine in-vivo Wirksamkeit schließen. Allerdings dürfte es sich hier um einen, gegenüber den anderen Macroliden abweichenden Wirkungsmechanismus handeln. Natürlich kann an dieser Stelle nichts über

die therapeutische Bedeutung der in-vivo beobachteten erhöhten Konzentration in einzelnen Geweben ausgesagt werden.

Beim Spectinomycin (Abb.: 26) lassen sich bezüglich der in-vitro Wirksamkeit 2 Gruppen von Stämmen unterscheiden. Nach einer bei allen Stämmen verlängerten lag-phase werden bei *M. anatis* und *M. gallisepticum* S₆ 208 die Maximaltiter der Kontrolle erreicht, bei *M. gallisepticum* 699, Serotyp I und TU-Stamm dagegen nicht. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß nach ZOLLI & MUTH (1967) Spectinomycin bei *M. gallisepticum* 699 im Tierversuch gute Wirksamkeit zeigt, während die gleiche Substanz bei *M. gallisepticum* S₆ 208 im Tierversuch gegenüber unbehandelten Kontrollen keine Wirkung hat. Das würde die Vermutung nahelegen, daß für die in-vitro Wirksamkeit die lag-phase Verlängerung von erheblich geringerer Bedeutung ist, als die Vermehrungsrate. So ausgelegt, entspricht der in-vitro Test in diesen beiden Fällen der in-vivo Wirksamkeit.

Die Verhältnisse bei der Verwendung von Oxytetracyclin (Abb.: 28) sind unterschiedlich. Die Stämme *M. gallisepticum* 699, 834/71 sowie der TU-Stamm verhalten sich ähnlich dem Tylosintyp, jedoch ohne lag-phase Verkürzung. Bei den Stämmen *M. anatis* und *M. gallisepticum* S₆ 208 in einem anderen Versuch, kommt es zur lag-phase Verlängerung und zu einem nachfolgenden Titeranstieg, der die Werte der Wachstumskontrolle erreicht. Der an-

schließende Titerabfall ist deutlich. Wir haben also bei der in-vitro Wirkung des Oxytetracyclins eine unterschiedliche Reaktion der verschiedenen Species, sowie innerhalb der Species, Stammunterschiede. Nach oben Gesagtem kann bei *M. anatis* mit einer in-vivo Wirkung nicht gerechnet werden. Entsprechende Angaben liegen in der Literatur nicht vor.

Über in-vivo Erfahrungen mit Oxytetracyclin bei *M. gallisepticum*-Infektionen wird viel berichtet, unter anderem von WHITEHILL & KISER (1961) und OLESIUK et al., 1964. Viele Autoren weichen aber in ihren Angaben deutlich voneinander ab.

Dosierungen von 200 - 1.000 ppm erbringen keine ausreichende Heilung der Luftsackläsionen. Nach den Ergebnissen des in-vitro Testes müßte jedoch bei einem Teil der Stämme (Tylosintyp oder Tylosinähnlich) eine in-vivo Wirkung zu erwarten sein. Dies ist wahrscheinlich eine Dosierungsfrage, denn GERLACH (1968) hat mit 200 mg/kg Kgw. eine dem Tylosin vergleichbare Wirkung erzielen können.

Das Lincomycin (Abb.: 27) bewirkt 2 Kurventypen. Nach einer bei allen Stämmen verlängerten lag-phase kommt es beim TU-Stamm nur zu einer geringen Keimvermehrung mit nachfolgendem Titerabfall, während im anderen Fall die Maximaltiter der Wachstumskontrolle erreicht werden (*M. gallisepticum* 699 und S₆ 208 in einem Versuch). Bei *M. anatis* und bei der Wiederholung eines Versuches mit *M. gallisepticum* S₆ 208 ist nach 10 h Versuchszeit

der Maximaltiter noch nicht erreicht, aber auch noch kein Anzeichen für einen Titerabfall erkennbar. Es ist möglich, daß bei einer Verlängerung der Versuchsdauer die Maximaltiter noch erreicht worden wären.

Lincomycin ist bisher nur in Kombination, aber nicht allein zur Bekämpfung aviärer Mycoplasmosen eingesetzt worden (HAMDY, 1970) . Seine in-vivo Wirksamkeit ist daher noch nicht generell gesichert. Nach den in-vitro Ergebnissen wäre lediglich eine Wirkung gegen den TU-Stamm zu erwarten.

Das Präparat 81.723 hfu zeigt ebenfalls 2 Wirkungstypen. Bei *M. gallisepticum* S₆ 208 kommt es nach einer lag-phase Verlängerung zu exponentiellem Wachstum mit Erreichen der Kontrollwerte und anschließend steilem Titerabfall, während bei *M. anatis* nach dem Erreichen der Kontrollwerte die Keimzahlen noch zunehmen (Abb.: 29) . Auch hier lassen die Ergebnisse erwarten, daß es sich um einen abweichenden Wirkungsmechanismus handelt. Nach Institutsuntersuchungen wirkt die Substanz gegen *M. gallisepticum* dem Tylosin vergleichbar. Demzufolge wäre der Titerabfall bei Versuchsende das wesentlichste Moment. Eine Wirkung auf *M. anatis* wäre nach dem in-vitro Test nicht zu erwarten.

Die Analyse des Resistenztestes mit subletalen Antibiotikadosen hat demnach zu einer befriedigenden Übereinstimmung zwischen in-vitro Ergebnissen und in-vivo Erfahrungen ge-

führt, mit Ausnahme von Oxytetracyclin. Es läßt sich zumindest aussagen, ob ein Chemotherapeuticum überhaupt in der Lage ist, unter den in-vitro vorliegenden Umständen die Keimvermehrung früher oder später zu hemmen. Es bleibt, wie bei allen Resistenztesten die offene Frage, ob dies auch unter den im Organismus vorliegenden Bedingungen erreicht wird. Bei Mycoplasmen erscheint dieser Analogieschluß umso schwieriger, weil es therapeutisch oft weniger darum geht, ein septikämisches Stadium zu erfassen, als die Mycoplasmen in verschiedenen Geweben zu erreichen. Der Tierversuch kann durch den Röhrchenverdünnungstest nicht ersetzt werden.

F ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Reihenverdünnungstest für die Bestimmung der MIC (minimum inhibition concentration) von 7 verschiedenen Antibiotica (Tylosin, Erythromycin, Spiramycin, Oxytetracyclin, Lincomycin, Spectinomycin und 81.723 hfu) gegenüber 4 verschiedenen aviären Mycoplasma-Serotypen (*M. gallisepticum*, *M. anatis* TU-Stamm und Feldstamm 834/71) angewendet.

Zur Analyse der Vorgänge in der Kultur (Lag-phase Bestimmung, Generationszeit, Verhalten der Keimtiter) wurden subletale Antibioticadosen benützt und im stündlichen Abstand über 10 h titriert.

Es wurden 5 verschiedene Verhaltensmuster der Stämme gegenüber den Antibiotica festgestellt:

- Lag-phase Verkürzung mit nachfolgendem im Vergleich zur Wachstumskontrolle geringem Keimzahlanstieg bei Tylosin, Erythromycin und Oxytetracyclin (*M. gallisepticum* 699, TU-Stamm und 834/71) .
- Lag-phase Verkürzung mit anschließendem Keimtiteranstieg bis auf Werte der Wachstumskontrolle und folgendem Titerabfall, bei Spiramycin.
- Lag-phase wie bei der Wachstumskontrolle mit nachfolgendem geringen Keimzahlanstieg bei Oxytetracyclin (*M. gallisepticum* S₆ 208) .
- Lag-phase Verlängerung mit nachfolgendem geringen Keimzahlanstieg bei Lincomycin (außer *M. gallisepticum* S₆ 208 und 699) und Spectinomycin (außer *M. anatis* und *M. gallisepticum* S₆ 208)

- Lag-phase Verlängerung mit nachfolgendem Keimzahlanstieg auf Werte der Wachstumskontrolle mit und ohne sich anschließenden Titerabfall, bei Lincomycin (*M. gallisepticum* S₆ 208 und 699), Oxytetracyclin (*M. anatis*), Spectinomycin (*M. anatis* und *M. gallisepticum* S₆ 208) und 81.723 hfu .

Die Ablesung des Resistenztestes im Reihenverdünnungstest kann nicht vom Verhalten der Wachstumskontrolle abhängig gemacht werden, da in den vom Antibioticum beeinflussten Kulturen maximale Keimtiter zeitverzögert auftreten. Wegen der reduzierten Stoffwechselaktivität ist eine zusätzliche Kontrolle des Wachstums mittels Plattenkulturen notwendig.

G SUMMARY

In the paper presented here, the tube dilution test was used to determine the minimum inhibition concentration (MIC) of 7 antibiotics (tylosin, erythromycin, spiramycin, oxytetracyclin, spectinomycin, lincomycin and 81.723 hfu) against 4 different avian *Mycoplasma* serotypes (M. gallisepticum S₆ 208 and 699, M. anatis, TU-strain and the field-strain 834/71) .

To analyse the occurrences in the cultures (lag-phase determination, generation time, movements of the germ titer) sublethal doses were necessary and the cultures were titrated in hourly intervals for 10 h.

There were 5 different patterns of reaction of the strains in the presence of antibiotics:

- Shortening of the lag-phase followed by a small increase of the number of germs compared with the growth control, seen with tylosin, erythromycin and oxytetracyclin (M. gallisepticum 699, TU-strain and 834/71) .
- Shortening of the lag-phase followed by an increase of the number of germs up to the number of the growth control followed again by a titer decrease, seen with spiramycin.
- Duration of the lag-phase similar with the growth control followed by a small increase of the number of germs, seen with oxytetracyclin (M. gallisepticum S₆ 208) .

- Prolongation of the lag-phase followed by a small increase of the number of germs, seen with lincomycin (except *M. gallisepticum* S₆ 208, 699) and spectinomycin (except *M. anatis* and *M. gallisepticum* S₆ 208) .
- Prolongation of the lag-phase followed by an increase of the number of germs up to the number of the growth control with and without decrease of the titer afterwards, seen with lincomycin (*M. gallisepticum* S₆ 208 and 699) , oxytetracyclin (*M. anatis*) , spectinomycin (*M. anatis* and *M. gallisepticum* S₆ 208) and 81.723 hfu .

The time for reading the tube dilution test does not depend upon the titer increase in the growth control culture, because maximum germ titer occurs retardedly in the cultures influenced by antibiotics. Because of the reduced metabolic activity an additional control of the growth, using plate cultures, is necessary.

Tabelle 2

MIC-WERTE verschiedener Antibiotica bei *M. gallisepticum* Stämmen

in mcg/ml nach Newnham & Chu (1965)

	0,004	0,02	0,1	0,5	2,0	8,0	durchschn. Empfindlichkeit
TYLOSIN	A xxxxxx	xx	x	x			
	B xx	xxx					
	C x	x					0,0182
	D x	x					
SPIRAMYCIN	A x	x	xxxxx	xxxx	x		
	B		xx	xx	xxx		
	C			x			0,636
	D			x			
ERYTHROMYCIN	A x	xxxxxx	xxx	x			
	B	xx	xxxxx	x			0,123
	C			x			
	D		x				
TETRACYCLIN	A	x	xxxxx	xxx			
	B		x	x			0,26
	C			x			
	D		x				
OXYTETRACYCLIN	A	x	xxxxx	xxx	xxx		
	B			xxx	xxx		
	C			x		x	1,25
	D						
CHLORTETRACYCLIN	A		xxxxx	xx	xx		
	B		xx	xx	xx		
	C			x			0,664
	D		x				

Zeichenerklärung: x = Anzahl der getesteten Stämme; A: Britische Stämme; B: Nordamerikanische Stämme; C: Holländische Stämme; D: T-Stämme

Tabelle 3 a

MIC-WERTE verschiedener Antibiotica bei M.GALLISEPTICUM Stämmen in mcg/ml

		<u>Tylosin</u>	<u>Spiramycin</u>	<u>Erythrom.</u>	<u>Tetracycl.</u>	<u>OTC</u>
Domermuth et al. (1955)	A 5967	-	-	-	10	0,1
Barnes et al. (1960)	S6 295	-	-	245	-	-
Inglis et al. (1964)	A 514	0,008- 0,125	0,25	0,06	-	-
Sylvén (1965)	schwedische Stämme	0,1- 10,1	-	100	-	0,1- 10,1
Yoder et al. (1965)	A 293	0,1	-	-	-	-
Zanella et al. (1966)	Feldstämme	0,025	0,1-0,5	0,05-0,1	0,25-1,0	-
Laskin et al. (1967)	Feldstämme	-	-	-	1,0	-
Spanoghe et al. (1968)	Feldstämme	0,1-1,0 -100	0,1-1,0 -100	-	0,1-10	10

Erklärungen für Abkürzungen: OTC = Oxytetracyclin ; CTC = Chlortetracyclin

Tabelle 3 b

MIC-WERTE verschiedener Antibiotica bei M.GALLISEPTICUM Stämmen in mcg/ml

			<u>Tylosin</u>	<u>Spiramycin</u>	<u>Tetracycl.</u>	<u>Lincomyc.</u>	<u>Spectinom.</u>	<u>81723</u> <u>hfu</u>
Hamdy et al.	(1969)	S 6	0,1	-	-	5	3	-
Hamdy et al.	(1970)	S 6 u.a.	-	-	-	1-6	3-5 -20	-
Kuniyasu et al.	(1974)	jap.St.	0,1-1,0 +resistente Stämme	-	-	-	-	-
Drews et al.	(1975)	S 6 u.FS9	0,0062	-	0,62-1,25	-	-	0,0039- 0,0078
Drews et al.	(1975)	PG 31	0,0031	-	0,62	-	-	0,0062

Tabelle 4 a

MIC-WERTE verschiedener Antibiotica bei anderen Mycoplasma-Serotypen in mcg/ml

	<u>Erythromycin</u>	<u>81.723 hfu</u>	<u>Tetracyclin</u>	<u>OTC</u>	<u>OTC</u>
Yamamoto et al. (1956) path. aviär	1,56-100	-	1,6-6,25	1,65-25	1,5-100
Barnes et al. (1960) St.540	0,125	-	-	-	-
Osborn et al. (1960) Turkey Sinusitis	100	-	1,56	0,78	1,56
Gross (1961) path. aviär	0,01	-	1000	-	-
Drews et al. (1975) M. synoviae	-	0,031	0,15	-	-

Tabelle 4 b

MIC-Werte verschiedener Antibiotica bei anderen Mycoplasma-Serotypen in mcg/ml

		<u>Tylosin</u>	<u>Spiramycin</u>	<u>Tetracyclin</u>	<u>OTC</u>	<u>OTC</u>
Cook et al.	(1963) Feldstamm Turkey sinusitis	-	0,5	-	-	-
Newnham & Chu	(1965) Serotyp D	0,1	0,5-2,0	0,1	2,0	0,5
Newnham & Chu	(1965) Iowa 695	0,02	2,0	-	8	8
Newnham & Chu	(1965) Serotyp B	0,1-0,5	8	0,1-0,5	8	2-40
Newnham & Chu	(1965) Serotyp C	0,004-0,1	0,5-2,0	-	0,5-2,0	0,1-2

Hamdy et al. (1969) M. meleagridis Tylosin:0,5; Lincomycin:1,0; Spectinomycin:1,0;

Hamdy et al. (1970) Serotyp S,I,J,K Lincomycin:1,0-5,0; Spectinomycin:3,0-20,0;

Hamdy et al. (1970) Serotyp C Lincomycin:7,0; Spectinomycin:1,0;

T A B E L L E 5

MIC - WERTE verschiedener Antibiotica bei aviären Mycoplasmenstämmen

	in mcg/ml						
	<u>Tylosin</u>	<u>Spiramycin</u>	<u>Erythromycin</u>	<u>Lincom.</u>	<u>OTC</u>	<u>Spectinomyc.</u>	<u>81.723 hfu</u>
M.gallisepticum S 6 208	0,062 ^x	0,62	0,15 ^x	5	0,5 ^x	0,62	0,15
M.gallisepticum 699	0,065 ^x	0,31	0,15	5	0,62	1,25	0,075
M.anatis	0,06 ^x	0,15	0,31	5	1,25	0,62	0,075
TU-Stamm	0,075	0,31	0,15	2,5	0,75 ^x	0,62	-
834/71 Feldstamm	0,037	0,62	0,31	2,5	0,62	1,25	-

Die mit ^x -bezeichneten Werte sind Laborwerte des Instituts

TABELLE 6

In den Versuchen gewählte Antibiotikakonzentrationen in mcg/ml

	<u>Tylosin</u>	<u>Spiramycin</u>	<u>Erythromycin</u>	<u>Lincomycin</u>	<u>OTC</u>	<u>81723 hfu</u>	<u>Spectinomycin</u>
M.gallisepticum S 6 208	0,03	0,06	0,10	2,0/2,5	0,25	0,06	0,2
M.gallisepticum 699	0,03	0,06	0,06	2,5	0,2	-	0,3
M.anatis	0,02	0,06	0,06	2,0	0,1	0,03	0,2
TU-Stamm	0,02	0,06	0,06	2,5	0,5	-	0,2
834/71 Feldstamm	0,02	0,06	0,06	-	0,2	-	0,2

Ergebnisse der Stämme M.gallisepticum S 6 208 und 699

	<u>Tylosin</u>	<u>Spiram.</u>	<u>Erythrom.</u>	<u>Spectinom.</u>	<u>OTC</u>	<u>Lincom.</u>	<u>81.723 hfu</u>
Keine Verzögerung der lag-phase	-	-	-	-	X	-	-
Verkürzung der lag-phase	XXXX	XXX	XX	-	X	-	-
Verlängerung der lag-phase	-	-	-	XXX	X	XXX	X
Erreichen der Kontrollwerte	X	XX	-	X	-	XX	X
Nichterreichen der Kontrollwerte	XXX	X	XX	XX	XXX	XX	-
Titerabfall auf Ausgangswerte	XXX	XX	X	X	XXX	-	X
Leichter Titerabfall	X	X	X	X	-	X	-
Anzahl der Versuche/Antibioticum	XXXX	XXX	XX	XXX	XXX	XXX	X

T A B E L L E 8

Ergebnisse der Stämme M.anatis, TU-Stamm, Feldstamm 834/71

	<u>Tylosin</u>	<u>Spiramyc.</u>	<u>Erythromyc.</u>	<u>Spectinom.</u>	<u>OTC</u>	<u>Lincom.</u>	<u>81.723hfu</u>
Keine Verzögerung der lag-Phase	-	-	-	834/71	M.anatis	-	-
Verkürzung der lag-phase	M.anatis TU-Stamm 834/71	M.anatis TU-Stamm 834/71	M.anatis TU-Stamm 834/71	-	TU-Stamm 834/71	-	-
Verlängerung der lag-phase	-	-	-	M.anatis TU-Stamm	-	M.anatis TU-Stamm	M.anatis
Erreichen der Kontrollwerte	-	834/71	-	M.anatis 834/71	M.anatis 834/71	-	M.anatis
Nichterreichen der kontrollwerte	M.anatis TU-Stamm 834/71	M.anatis TU-Stamm	M.anatis TU-Stamm 834/71	-	834/71	M.anatis TU-Stamm	-
Titerabfall auf Ausgangswerte nach der exponentiellen Phase	M.anatis TU-Stamm	834/71	M.anatis TU-Stamm 834/71	-	TU-Stamm	-	-
Leichter Titerabfall nach der exponentiellen Phase		M.anatis TU-Stamm	-	-	M.anatis TU-Stamm	-	-

M. gallisepticum S 6 208

Kelmeinsaat: 10⁶

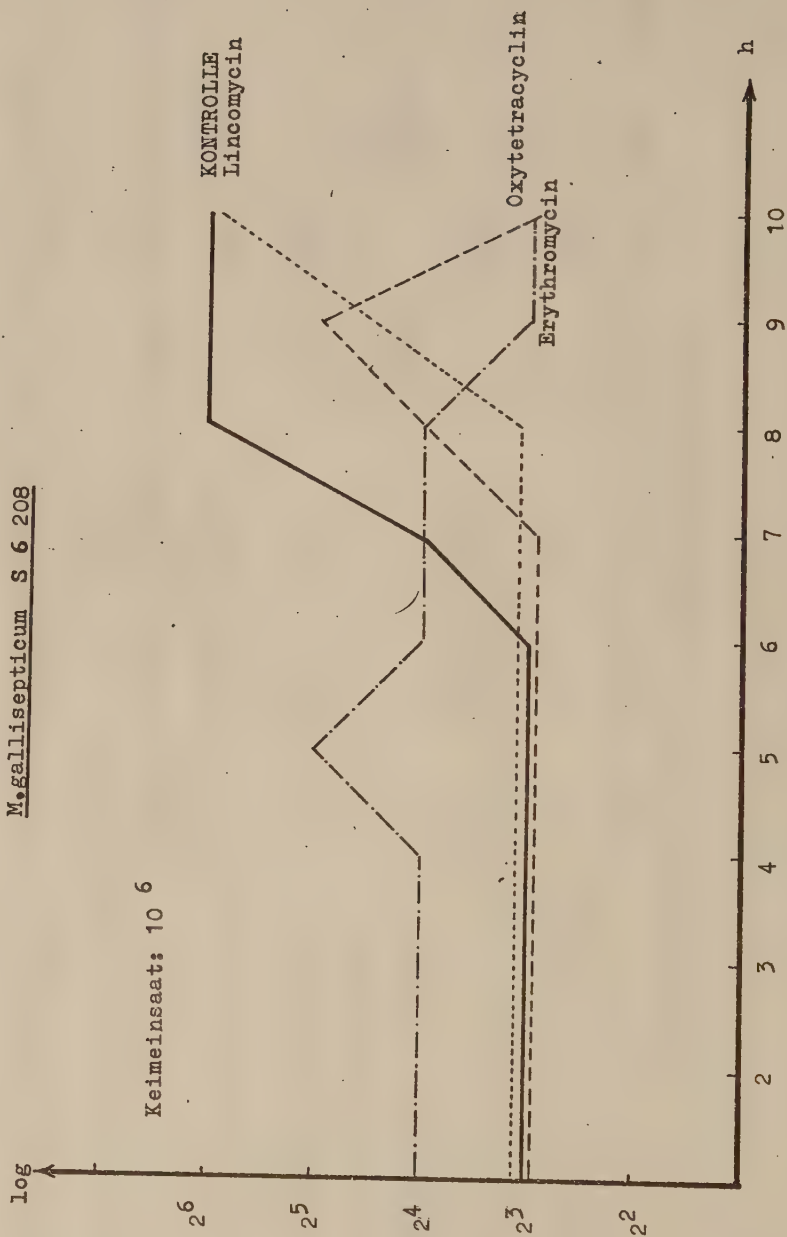


Abbildung 9

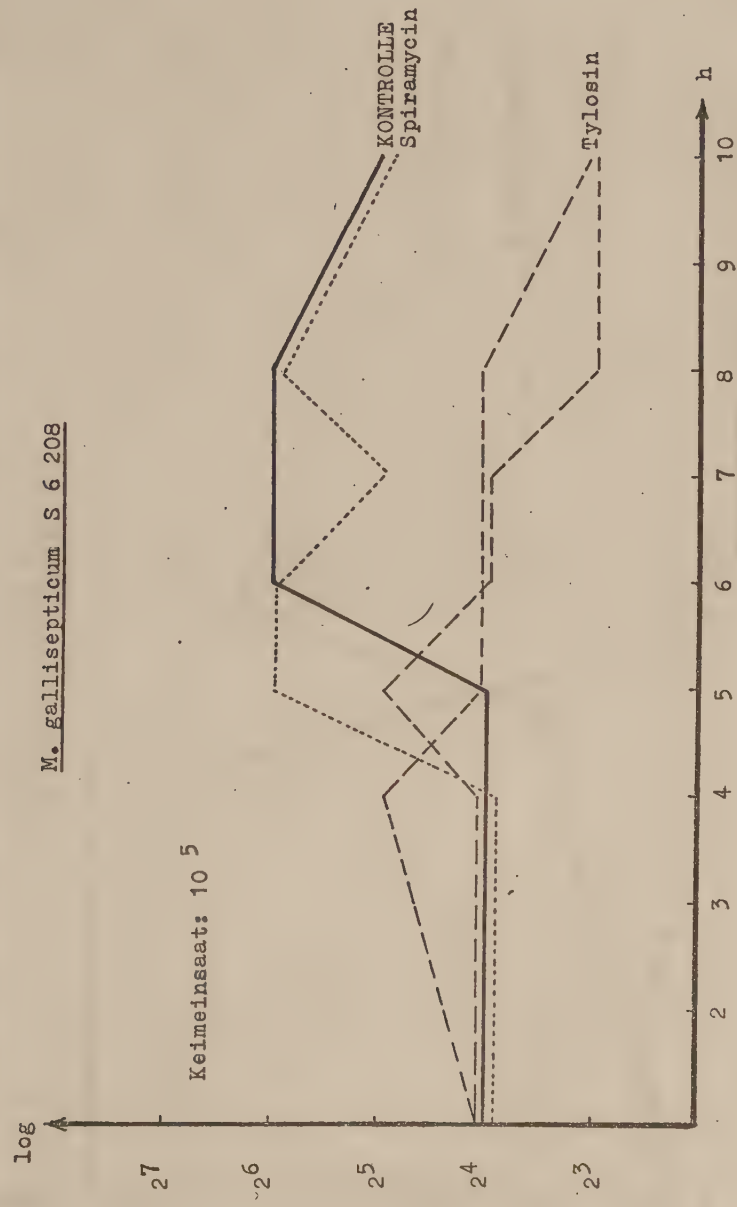


Abbildung 10

M.gallisepticum S 6 208

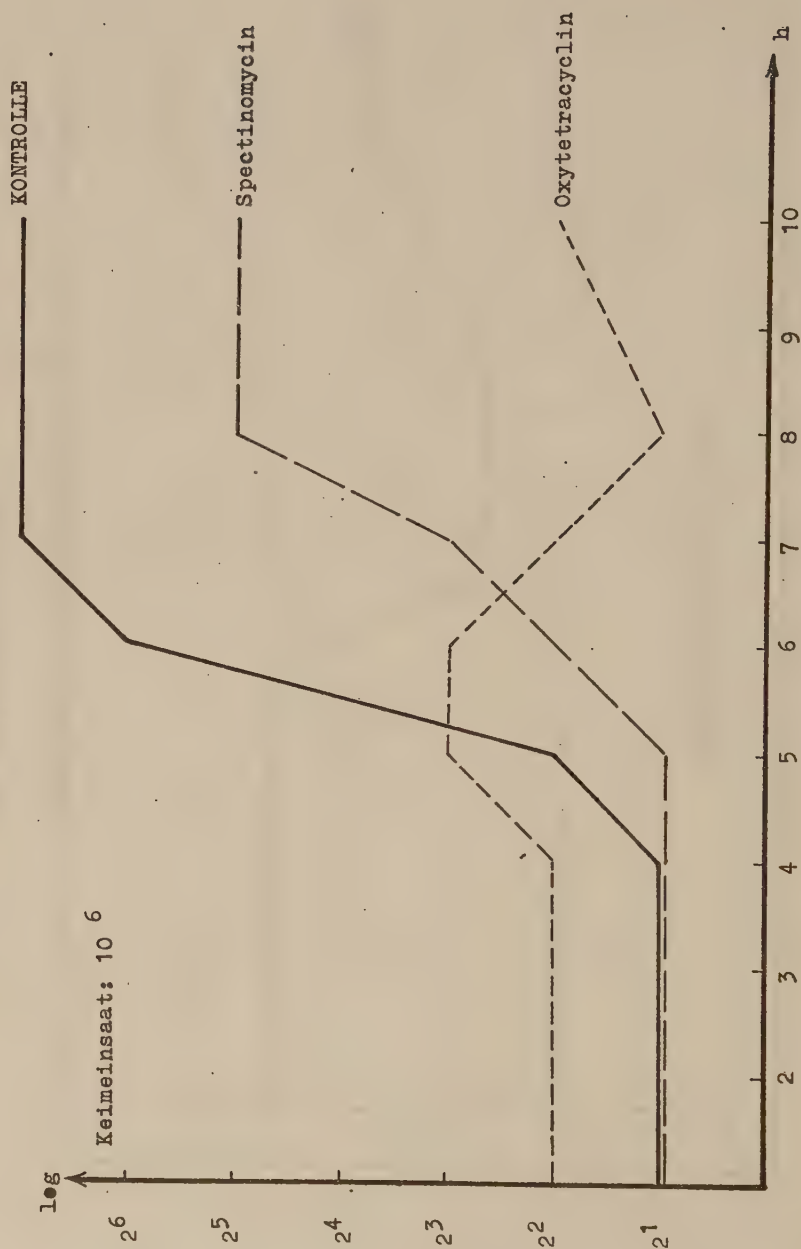


Abbildung 11

M.gallisepticum S 6 208

Keimeinsaat: 10^6

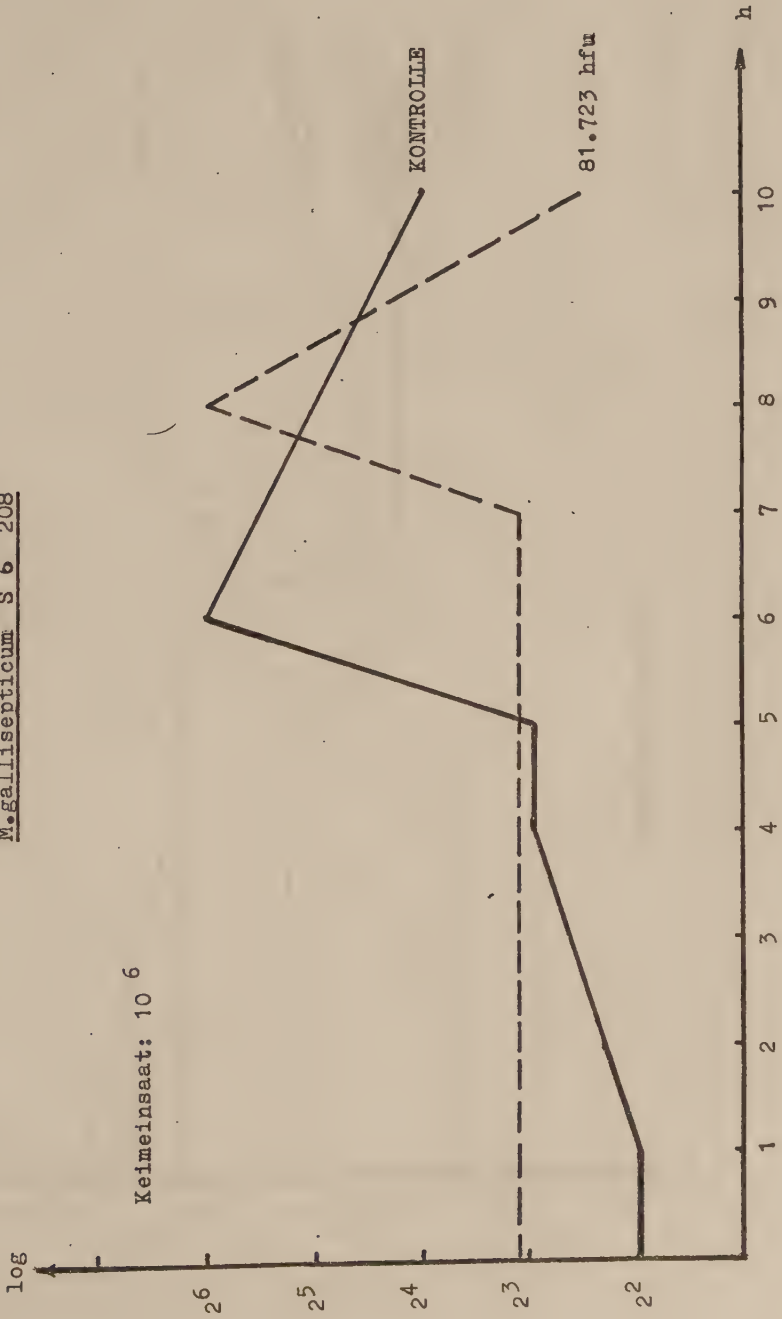


Abbildung 12

M. gallisepticum 699

Keimeinsaat : 10^6

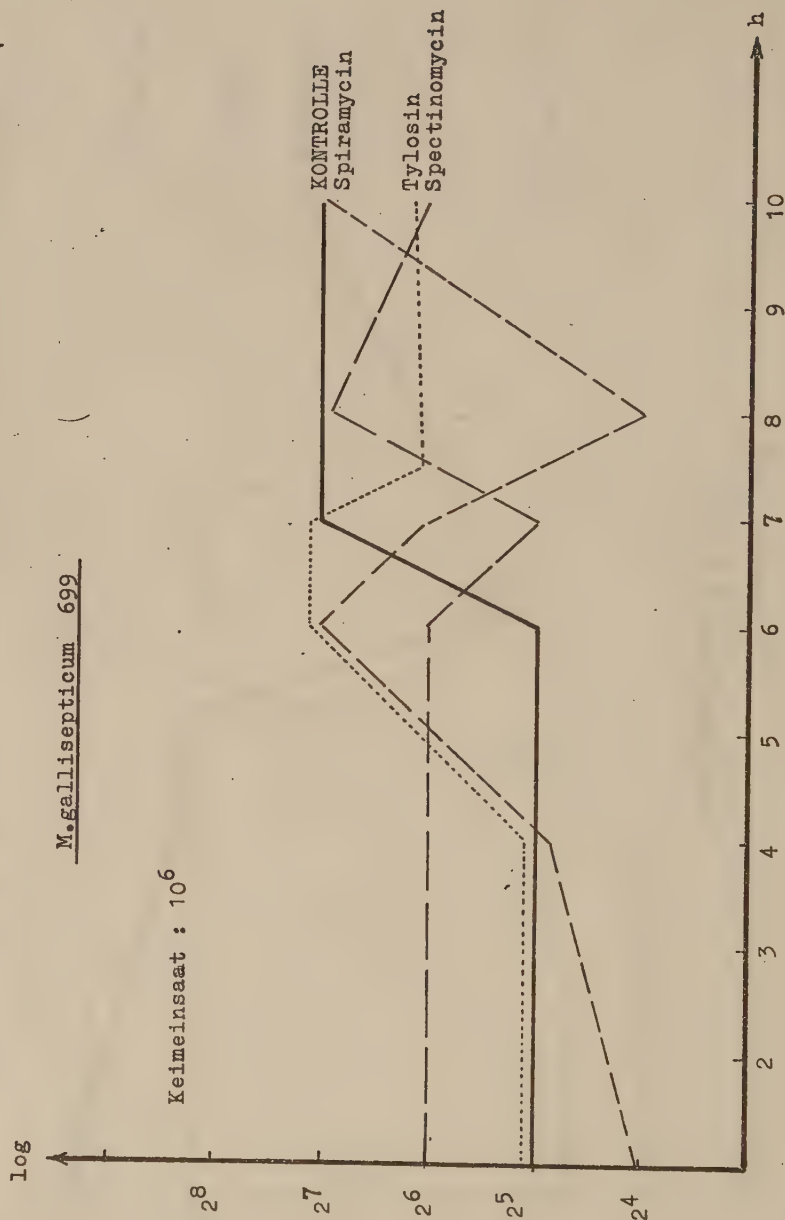


Tabelle 14

log

M. gallisepticum 699

Keimeinsaat : 10⁵

2⁷

2⁶

2⁵

2⁴

2³

2²

KONTROLLE

Erythromycin
Tylosin

Spiramycin
Spectinomycin

Oxytetracyclin

h

10

9

8

7

6

5

4

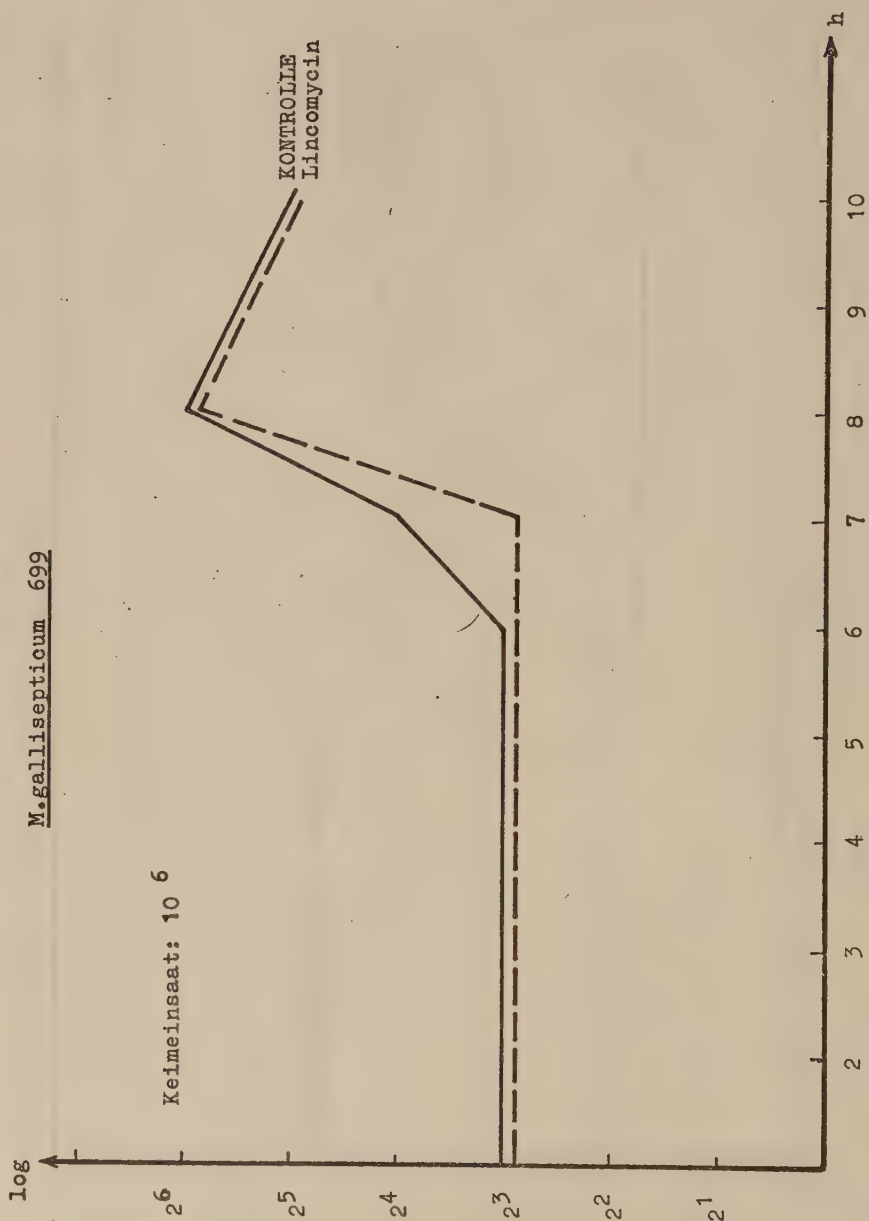
3

2

Abbildung 15

M.gallisepticum 699

Keimeinsaat: 10⁶



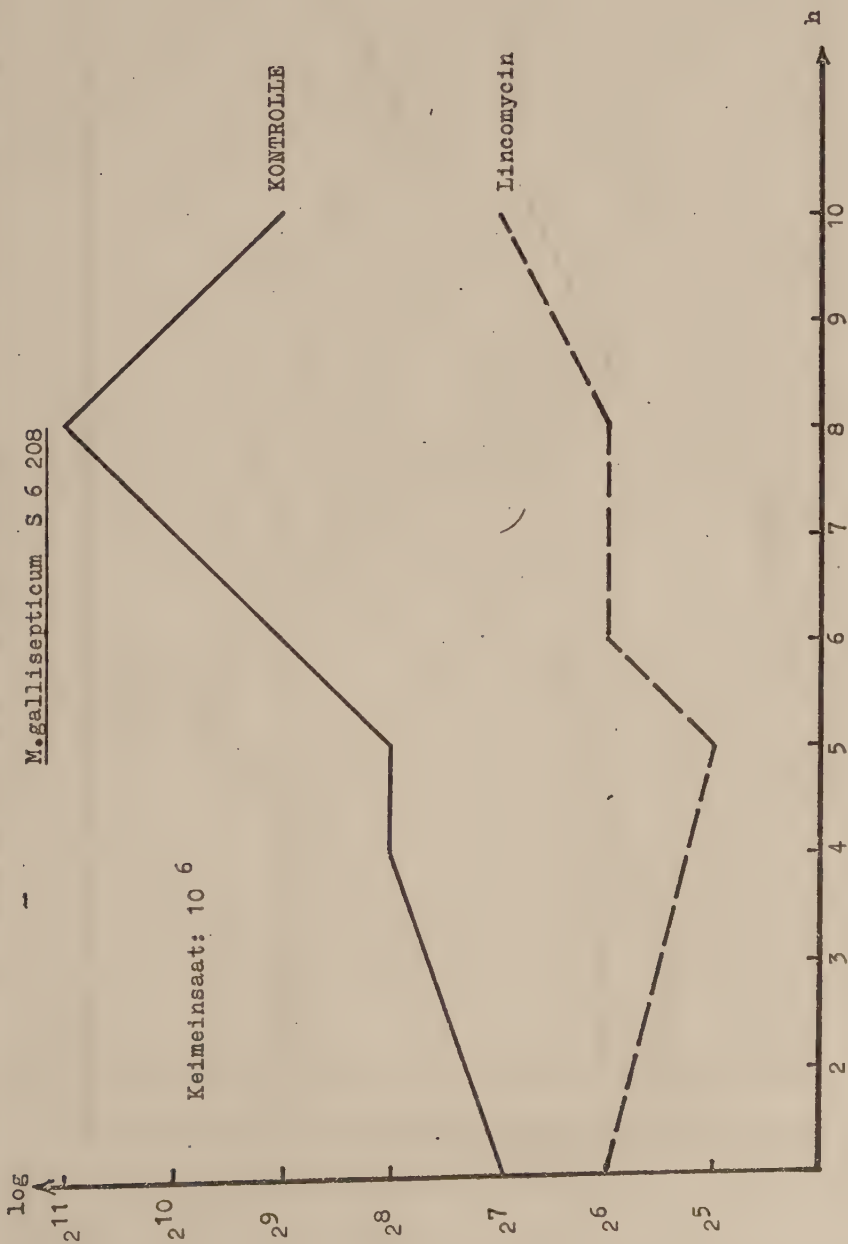


Abbildung 16a

log

M. anatis

Keimeinsaat: 10⁵

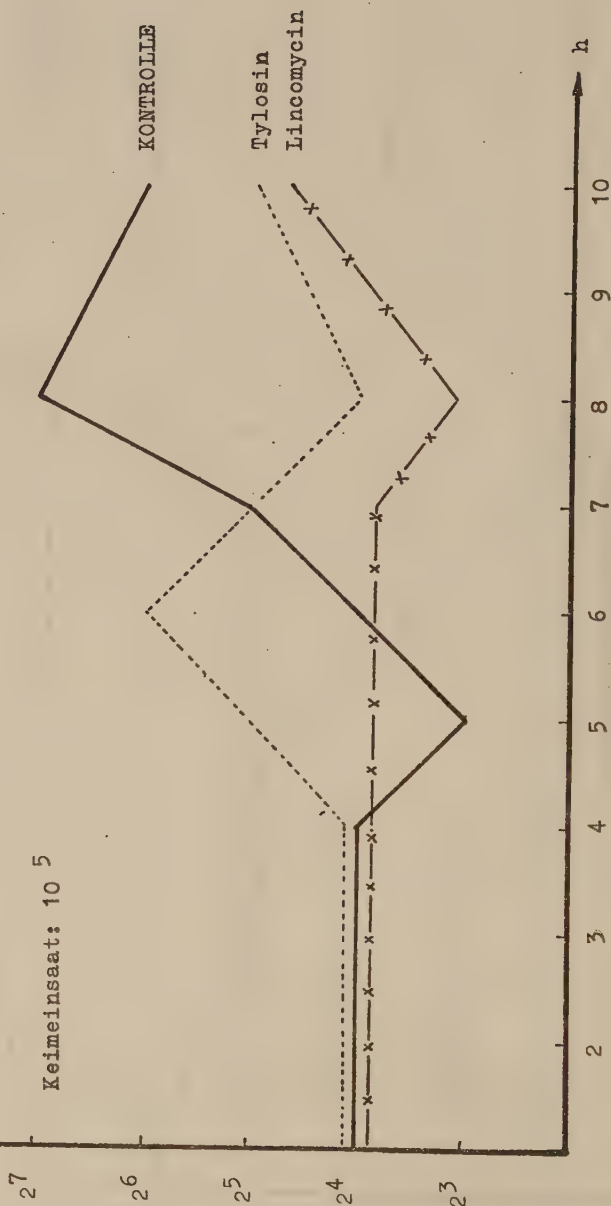


Abbildung 17

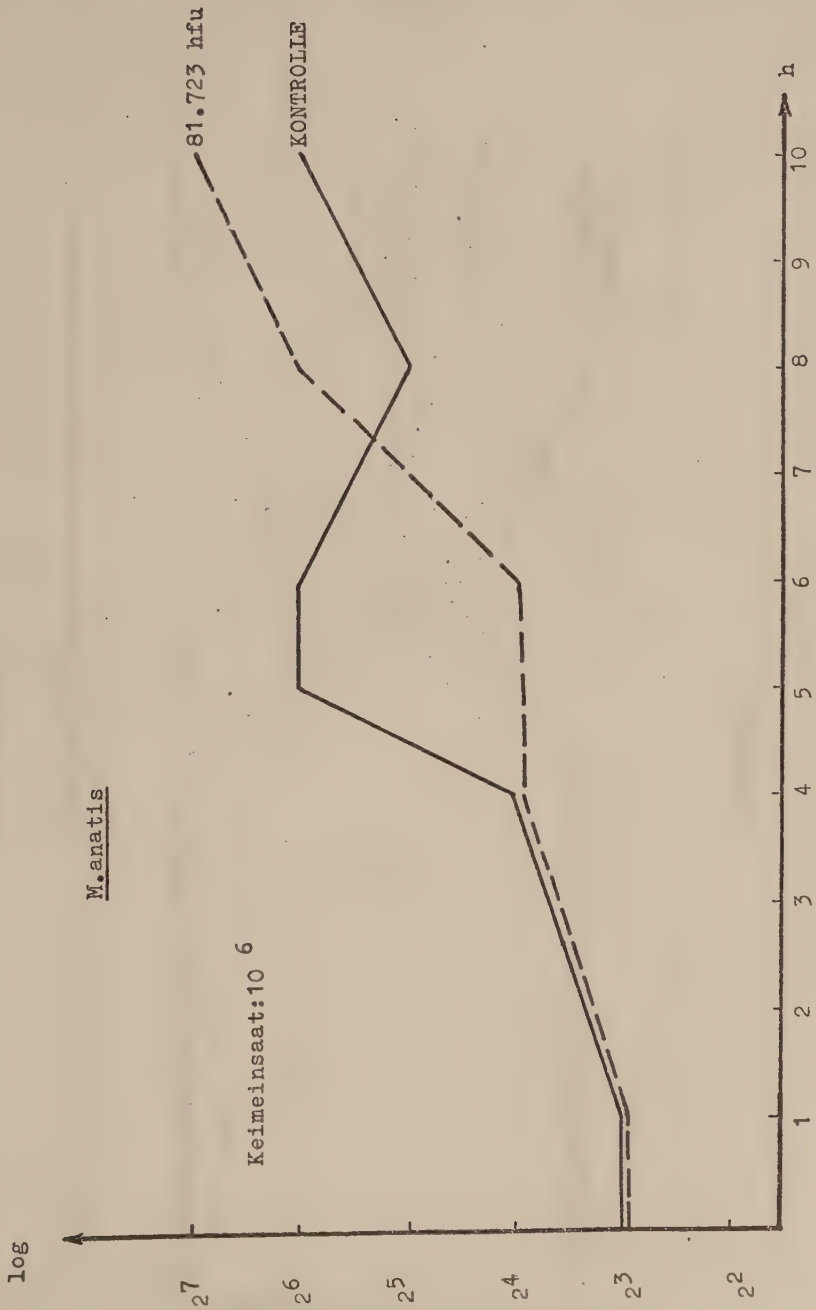


Abbildung 18

M. anatis

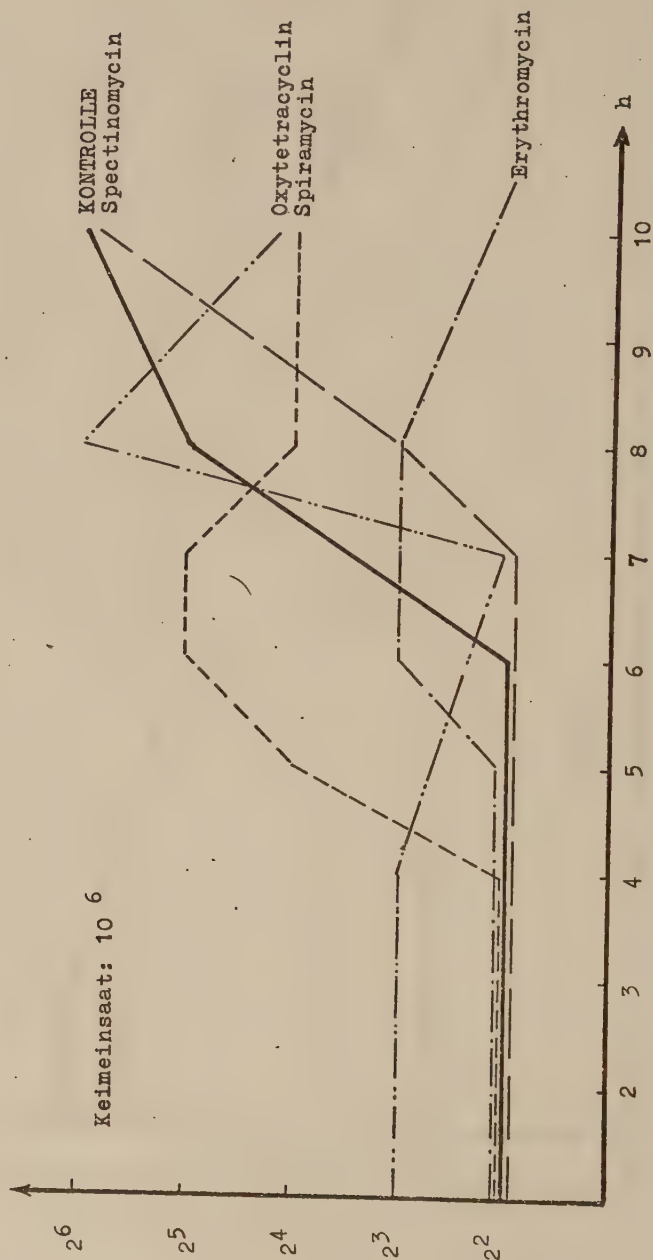


Abbildung 19

T U - Stamm

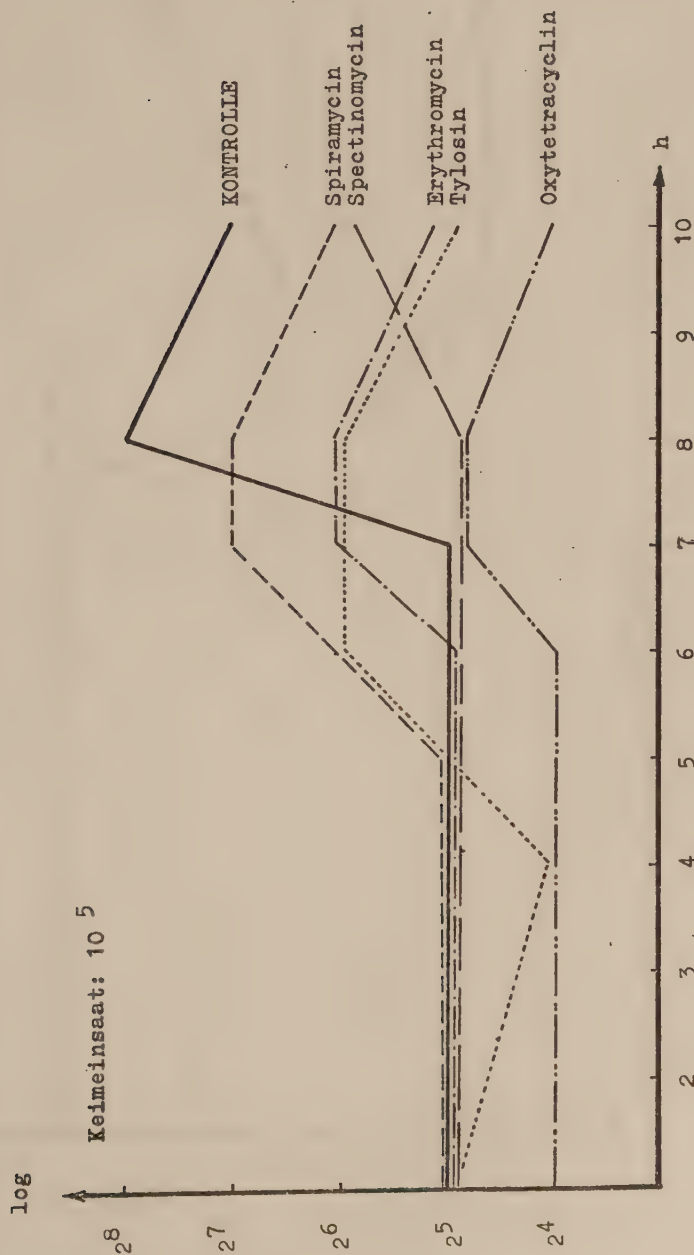


Abbildung 20

T U - Stamm

Keimeinsaat: 10^6



Abbildung 21

Feldstamm 834 / 71

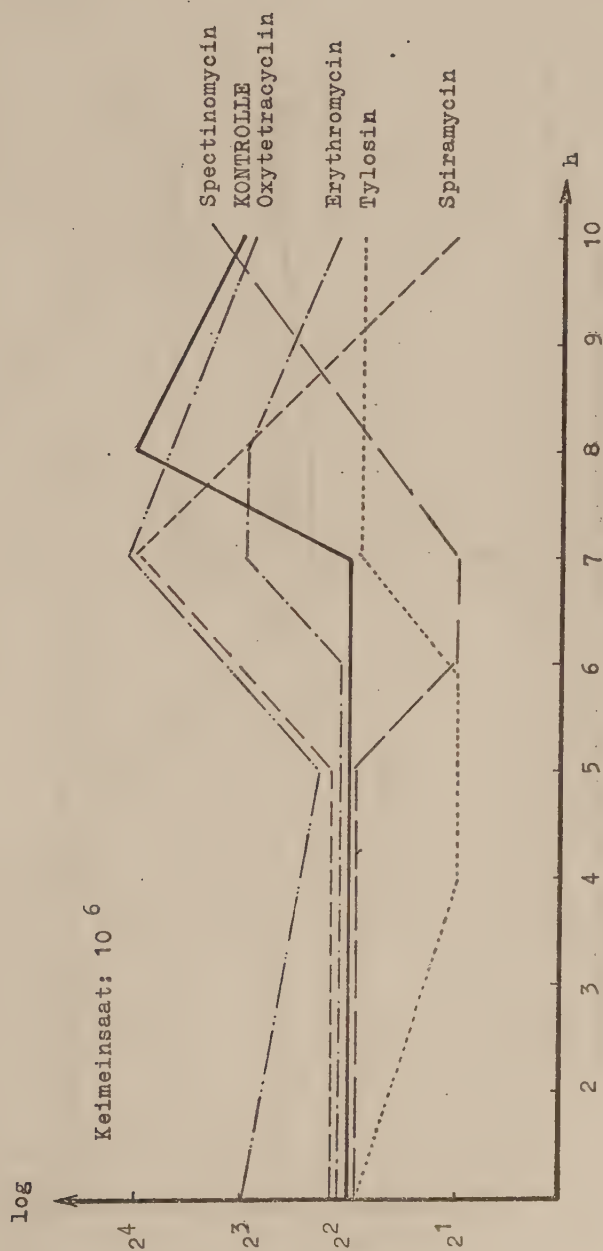


Abbildung 22

Mittelwertdarstellung von TYLOSIN bei *M. gallisepticum* Stämmen

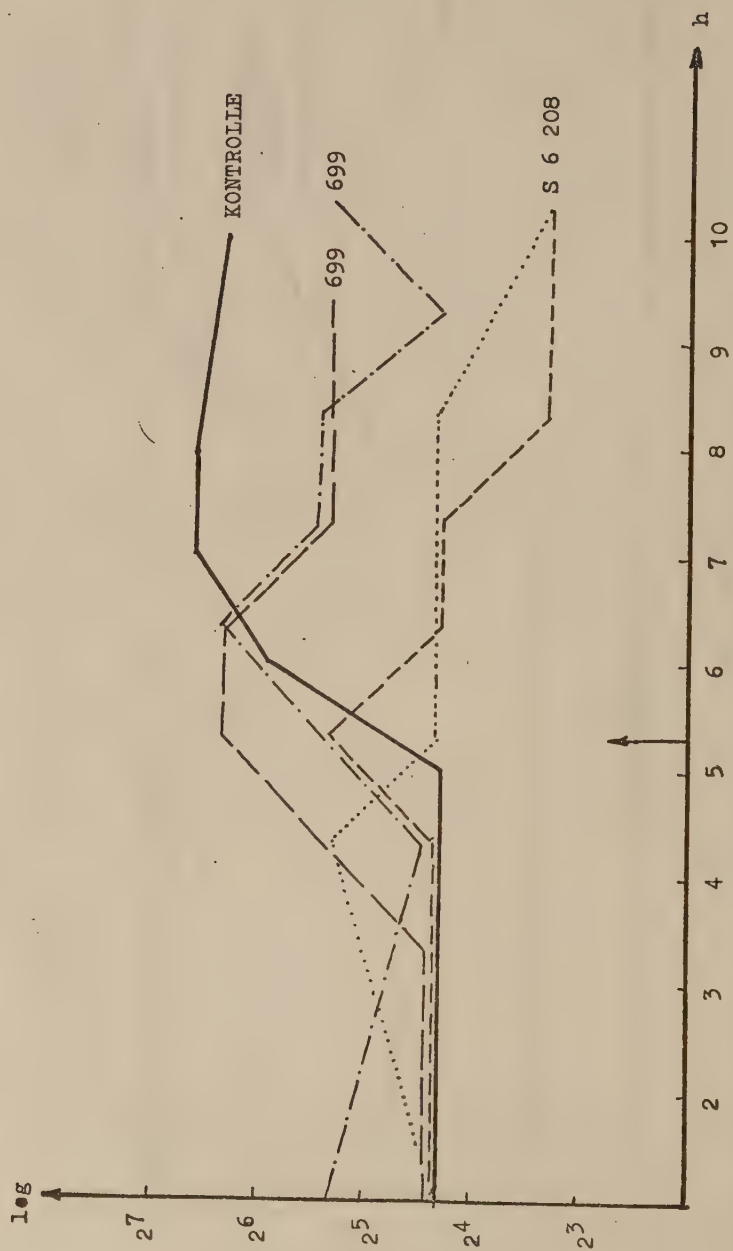


Abbildung 23 a

Mittelwertdarstellung von TYLOSIN bei anderen aviären Mycoplasma-Serotypen

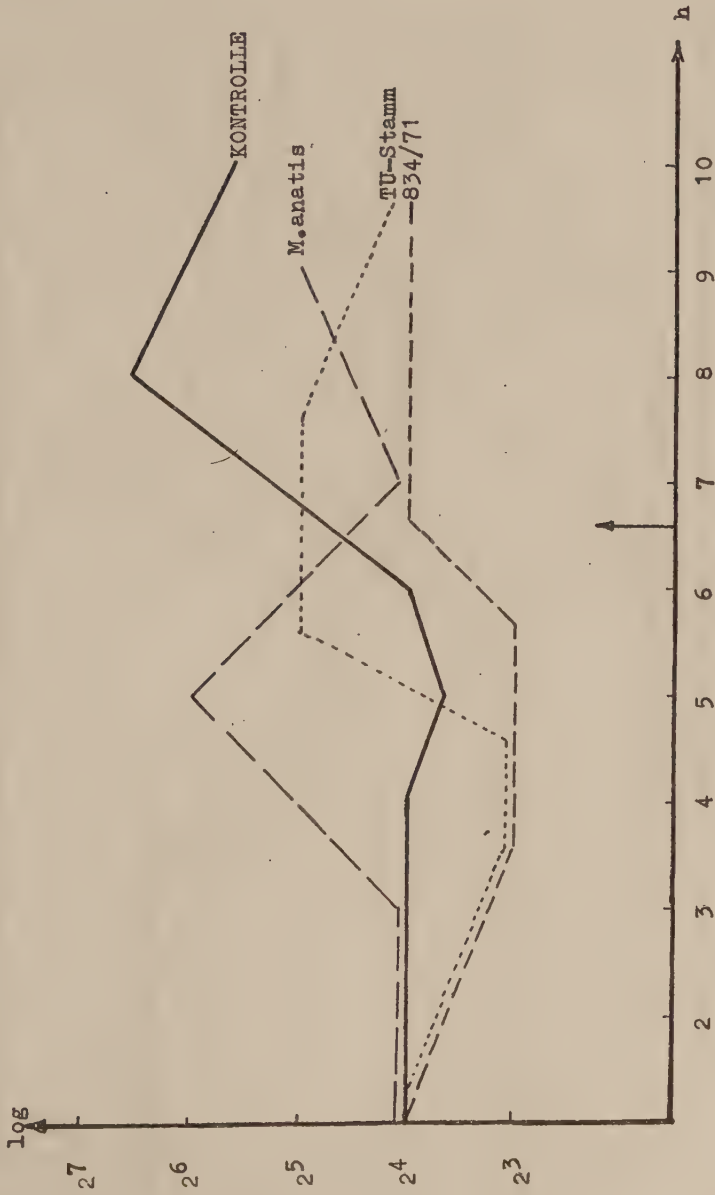


Abbildung 23 b

- 70 -

Mittelwertdarstellung SPIRAMICIN

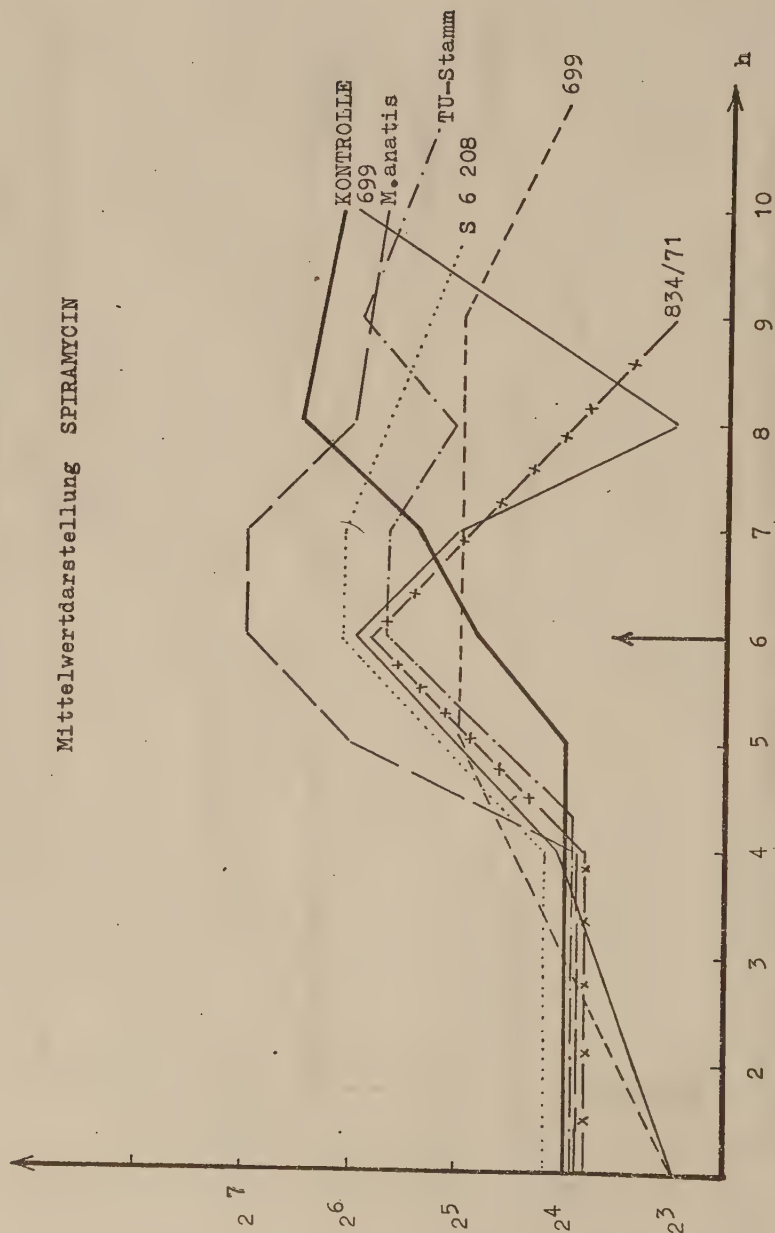


Abbildung 24

Mittelwertdarstellung ERYTHROMYCIN



Abbildung 25

Mittelwertdarstellung SPECTINOMYCIN

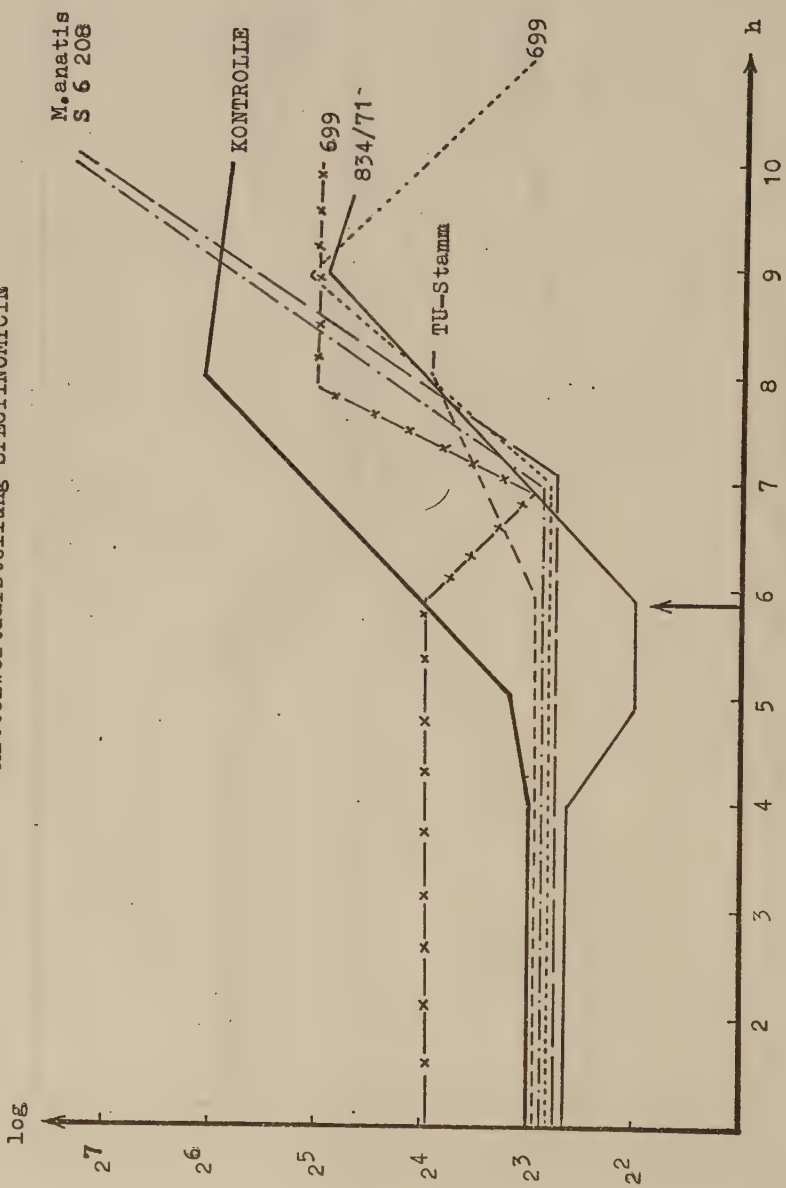


Abbildung 26

Mittelwertdarstellung LINCOMYCIN

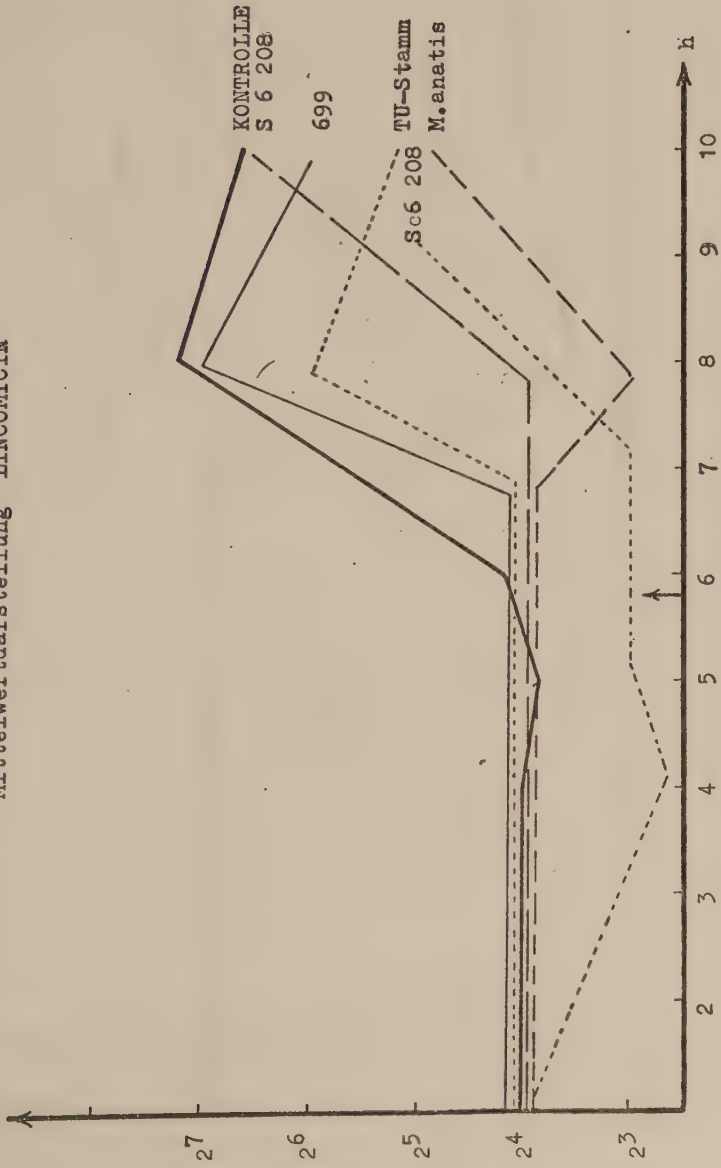


Abbildung 27

Mittelwertdarstellung OXYTETRACYCLIN

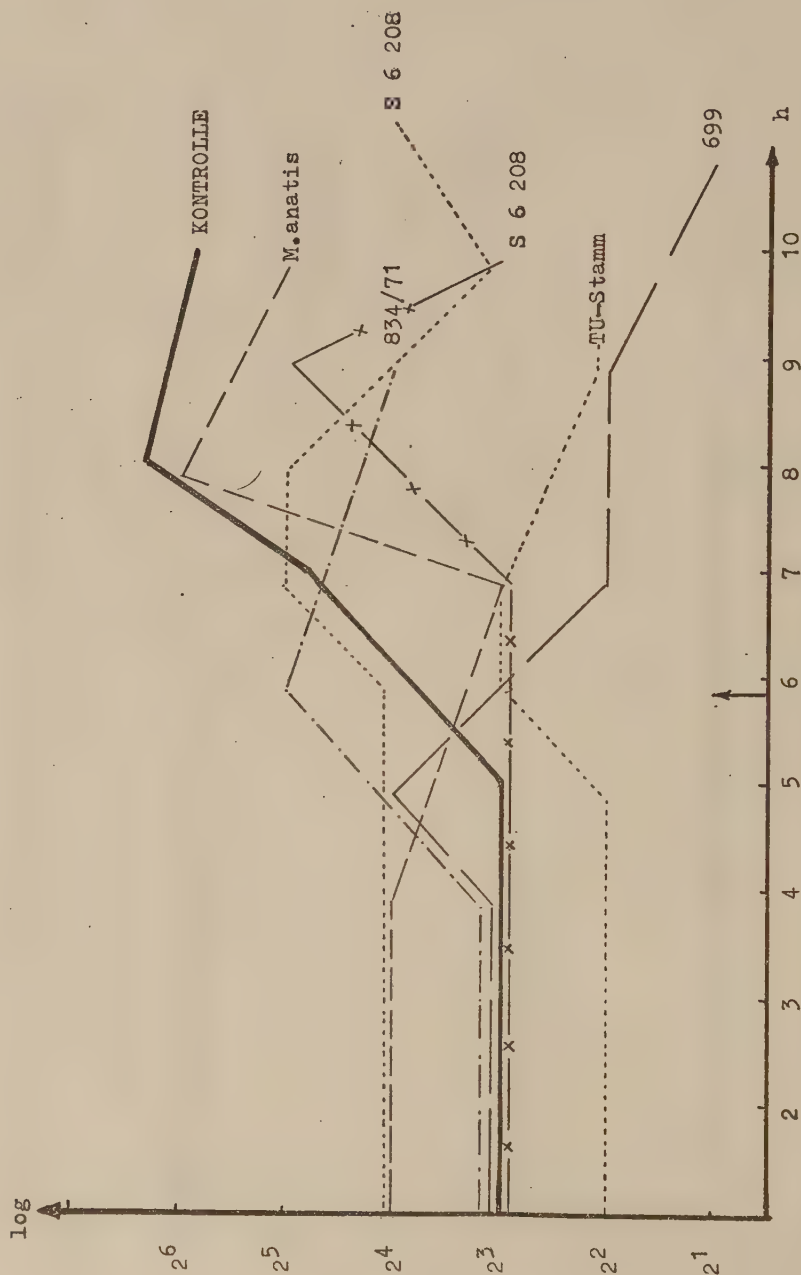


Abbildung 28

Mittelwertdarstellung 81.723 hfu

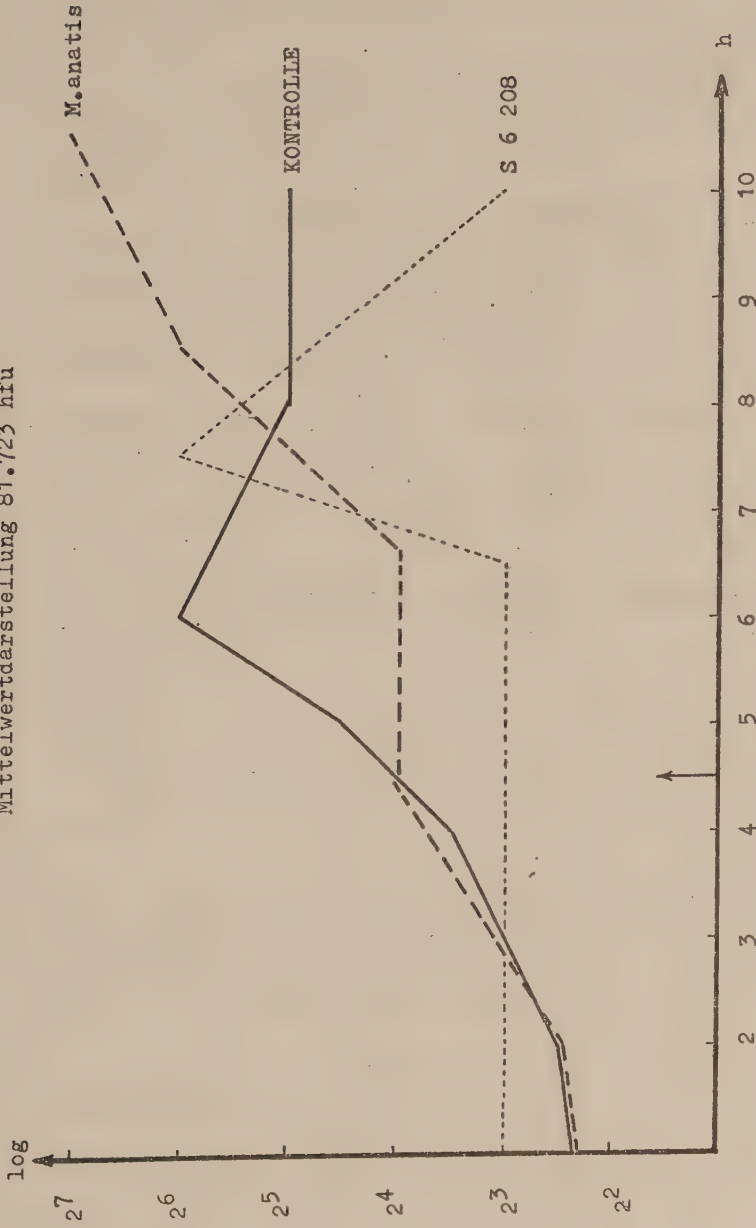


Abbildung 29

I L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ABBOT - BULLETIN: Spectam - Injektionslösung
Technisches Bulletin der Abbot -Labora-
torien 2, 5 (keine Jahresangabe)

ADLER ,H.E., R. YAMAMOTO and R.A. BANKOWSKI:

A preliminary report of efficiency of
various mediums for isolation of PPLO
from exudate of birds with CRD.
Amer. J. Vet. Res. 15, 463 - 465 (1954)

BARBER, T.L. and J. FABRICANT : Primary isolation of myco-
plasma organisms (PPLO) from mammalian
sources.

J. Bakt. 83, 1268 - 1273 (1962)

BARBER, T.L. and J. FABRICANT : A suggested reclassifi-
cation of avian mycoplasma serotypes.
Avian. Dis. 15, 125 - 138 (1971)

BARNES, L.E., E.E. OSE and L.F. ELLIS : Tylosin treatment
of experimental Mycoplasma gallinarum
infections of chickens and turkeys.
Antimicrob. Agents Ann. 605 - 611 (1960 a)

BARNES, L.E., E.E. OSE and F.O. GOSSETT : Treatment of ex-
perimental PPLO -Infections in young
chickens with Tylosin, a new antibiotic.
Poultry Sci. 34, 1376 - 1381 (1960 b)

BARNES, L.E., E.E. OSE and F.O. GOSSET : Treatment of ex-
perimental infectious sinusitis of tur-
keys with Erythromycin.
Avian Dis. 4, 176 - 187 (1960 c)

- BETTENCOURT, R.F. : The effect of Lincomycin, Erythromycin and Tetracycline on the Mycoplasma-species of man. ((1966)
Gonzaga High School, Washington D. C.
- BRANDER, G.C. and D.M. PUGH : Veterinary applied pharmacology and therapeutics.
Bailliére Tindall- London (1971)
p. 334, 336- 338
- BRUNNER, R. und G. MACHEK : Die mittleren Antibiotica
Verlag Hans Karl, Nürnberg (1965)
S. 104
- BUTLER, M. and B.C.J.G. KNIGHT : The measurement of the growth of Mycoplasma in a liquid media.
J. Gen. Microbiol. 22, 478- 482
(1960)
- CHANOCK, R.M., L. HAYFLICK and M.F. BARILE : Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO .
Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 541 - 549 (1962)
- COOK, I.K.A., J.M. INGLIS and W.G.C. PARKER : Spiramycin adipate in the treatment of mycoplasmosis in turkeys.
Vet. Rec. 75, 215 (1963)

COTTEW, G.S. and R.H. LEACH : Mycoplasmas of cattle, sheep and goats.

In: L. HAYFLICK, The Mycoplasmatales and the L- phase of bacteria

North Holland Publishing Company (1969)

p. 534

DOMERMUTH, C.H. and E.P. JOHNSON : An in vitro comparison of some antibacterial agents of avian pleuro-pneumonia-like organisms.

Poultry Sci. 34, 1395 - 1399 (1955)

DREWS, J., A. GEORGOPOULOS, G. LABER, E. SCHÜTZE,

J. UNGER : Antimicrobial activities of 81.723 hfu, a new pleuromutilin derivate.

Antimicrobial Agents and Chemother.

May 1975 507 - 516 (1975)

FABRICANT, C.G., P.J. van DENMARK and J. FABRICANT :

The effect of atmospherical environment upon the growth of Mycoplasma gallisepticum.

Avian Dis. 6, 328 - 331 (1962)

FABRICANT, J. and E.A. FREUNDT : Importance of extension and standardization of laboratory tests for the identification and classification of Mycoplasma.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 143, 50 - 58 (1967)

FREUNDT, E.A. : The Mollicutes

In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Edition, 930 - 943, (1974)

- FREUNDT, E.A. : Cellular morphology and mode of replication of the Mycoplasmas.
In: L. HAYFLICK, The Mycoplasmatales and the L-phase of Bacteria
North Holland Publishing Company (1969)
p. 281 - 311
- FRIEDRICH, H. : Zur Anwendung des Stoffwechselhemmtests (MI-Test) bei Mycoplasma gallisepticum.
Inaugural-Dissertation, Universität München (1970)
- GERLACH, H. : Zur Diagnostik der pathogenen Geflügelmycoplasmen.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 15,
297 - 300 (1967)
- GERLACH, H. : Probleme bei der Therapie der Gallisepticum-Mycoplasmosen des Geflügels.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 22,
448 - 452 (1968)
- GOREN, E. : Effectiveness of Spectinomycin against avian Mycoplasma cultures and cross-resistance with Tylosin.
Tijdschrift voor Diergeneeskunde 97,
1185 - 1188 (1972)
- GRIFFITH, L.J., W.E. OSTRANDER, C.G. MULLINS and D.E. BESWICK : Drug antagonism between Lincomycin and Erythromycin
Science 147, 746 (1965)
- GROSS, W.B. : The effect of Chlortetracycline, Erythromycin and Nitrofurans as treatment for experimental "air-sac" disease.
Poultry Sci. 40, 833 - 841 (1961)

HALLMANN, L. und F. BURKHARDT : Klinische Mikrobiologie
S. 584 (1974)

Gerorg Thieme Verlag, Stuttgart

HAMDY, A.H., L.C. FERGUSON, V.L. SANGER and BOHL :
Susceptibility of pleuro-pneumonia-like
organisms to the action of antibiotics
Erythromycin, Chlortetracyclin, Hygro-
mycin, Magnamycin, Oxytetracyclin and
Streptomycin.
Poultry Sci. 36, 748 - 754 (1957)

HAMDY, A.H. and C.J. BLANCHARD : Chemotherapy of airsac-
culitis-infection in chickens.

Bact. Procc. (1969a) p. 86

HAMDY, A.H., C.J. FARHO; C.J. BLANCHARD and M.W. GLENN :
Effect of Lincomycin and Spectinomycin
on airsacculitis of turkey poults.
Avian Dis. 13, 721 - 728 (1969 b)

HAMDY, A.H. : Efficacy of Lincomycin and Spectinomycin
against avian Mycoplasmas.
Antimicrobial Agents and Chemother.
(1970) p. 522 - 530

HAMDY, A.H. and C.J. BLANCHARD : In vitro activity of
Lincomycin and Spectinomycin against sero-
types of avian Mycoplasma.
Appl. Microbiol. 20, 26 - 30 (1970)

HEARN, H.J., J.E. OFFICER, V. ELSNER and A. BROWN :
Detection, elimination and prevention
of contamination of cell cultures with
pleuropneumonia-like organisms.
J. Bact. 78, 575 - 582 (1959)

- HEIN, I. Kritische Übersicht über die von den Herstellern eingereichten Dossiers für die Zulassung von bestimmten Antibiotica zum nutritiven Einsatz im Hühnerfutter. Inaugural Dissertation, Universität München (1974)
- HOROSZEWICZ, J. : Incidence of pleuro-pneumonia-like organisms (PPLO) in man.
Brit. J. Vener. Dis. 37, 183 - 186 (1961) .
- HOTTLE, G.A. and D.N. WRIGHT : J. Bact. 91, 1834 (1966)
zitiert nach ZAVADOVA-SUCHANOVA (1968)
- INGLIS, J.M. and J.K.A. COOK : Comparison of in vitro and in vivo activity of Spiramycin and Erythromycin against Mycoplasma gallisepticum.
J. Comp. Path. 74, 101 - 107 (1964)
- INGLIS, J.M. and R.C. JONES : Effect of dipping eggs in Spiramycin to inactivate Mycoplasma gallisepticum.
J. Comp. Path. 76, 225 - 229 (1966)
- KISER, J.S., F. POPKEN and J. CLEMENTE : The development of resistance to Spiramycin, Streptomycin, and Chlortetracycline by Mycoplasma gallisepticum in chick embryos.
Avian Dis. 5, 283 - 291 (1961)
- KUNTIYASU, C., Y. YOSHIDA and M. TAKANO : Spiramycin - and Tylosin- resistant strains of Mycoplasma gallisepticum isolated from breeding chickens and pipped eggs.
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 14, 42 - 47 (1974)

- LABER, G. and E. SCHÜTZE : In vivo efficiency of 81.723 hfu, a new pleuromutilin derivate against experimentally induced airsacculitis in chicks and turkey poults.
Antimicrobial Agents and Chemother.
May 1975 p. 517 - 521
- LAI, K.W. : Blutplasma-und Gewebsspiegel von Erythromycin-Glutamat bei Legehühnern.
Diss. med. vet. Hannover (1970)
- LASKIN, A.I. : Tetracyclines
In: D. GOTTLIEB and P.D. SHAW
Antibiotics I, Mechanism of Action
Springer- Verlag Berlin-New York
- McGUIRE, J.M., R.L. BUNCH, R.C. ANDERSON, H.E. BOAZ, E.H. FLYNN, H.M. POWELL, J.W. SMITH :
A new antibiotic - Erythromycin.
Antibiotics Chemoth. 2, 284 (1952)
- MELNIKOV, V.A. and J.V. RAKOVSKAYA : Dynamics of the *M. laidlawii* multiplication in a liquid media.
Vestn. Akad. med. Nauk. SSSR 24,
43 - 46 (1969)
- MEYNELL, G.G. and E. MEYNELL : Theory and Practice in Experimental Bacteriology. 2nd Edition
Cambridge University Press (1970)
- NEMTEANU, ST., V. STOENESCU, GH. DABIJA, C. SURDAN, A. POPET, V. RUSU, N. HANZU : Tratatul Medicamentos in Micoplasmoza Respiratorie Aviara.
Lucrarile Institutului de cercetari veterinare si biopreparate "Pasteur".
5, 197 - 211 (1966)

- NEWNHAM, A.G. and H.P. CHU : An in vitro comparison of the effect of some antibacterial, antifungal and antiprotozoal agents on various strains of *Mycoplasma* (pleuropneumonia-like organisms: P.P.L.O.).
J. Hyg., Camb. 63, 1 - 24 (1965)
- OLESIUK, O.M., H. van ROECKEL, and N.K. CHANDIRAMANI :
Control of experimental *Mycoplasma gallisepticum* infection in young chicks with Tylosin and other antibiotics.
Avian Dis. 9, 67 - 77 (1965)
- OSBORN, O.H., C.F. MATANEY and B.S. POMEROY : The effect of antibiotics on the infectious sinusitis agent of turkeys: the in vivo development of antibiotic resistant strains of *Mycoplasma*.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 79, 581 - 587 (1960)
- PINNERT-SINDICO, S., L. NINET, J. PREUD'HOMME and C. COSAR :
A new antibiotic - Spiramycin.
Antibiotics Ann. 1954/55 p. 724 - 727
- RODWELL, A. : Nutrition and metabolism of the *Mycoplasmas*.
In: L. HAYFLICK : The *Mycoplasmatales* and the L-phase of Bacteria
North Holland Publishing Company (1969)
p. 413 - 451
- SHARP, J.T. : Nutritional requirements
in: J.T. SHARP : The Role of *Mycoplasmas* and L-Forms of Bacteria in Disease.
Charles C. Thomas - Publisher (1970)
p. 11 - 16

- SILVEN, L. : In vitro sensitivity to antibiotics of
swedish strains of *Mycoplasma galli-
septicum*.
Acta vet. scand. 6, 234 - 238 (1965)
- SMITH, P.F. : Interaction of *Mycoplasmas* with their
environment.
In: P.F. SMITH : *The Biology of Myco-
plasmas*
Academic Press New York and London
(1971a) p. 182 - 197
- SMITH, P.F. : Modes of reproduction
In: L. HAYFLICK : *The Mycoplasmatales
and the L-phase of Bacteria*
North Holland Publishing Company (1969)
p. 147 - 152 (b)
- SPANOGHE, L., A. DEVOS, A. VIAENE and L. DEVRIESE :
De werking in vitro van Antibiotica
en Antiseptica op *Mycoplasma galli-
septicum*.
Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift
5, 217 - 230 (1968)
- SCHÜTZE, E. : Untersuchungen über Beeinflussbarkeit
von *Mycoplasmen* durch Antibiotica in
vitro und in vivo.
*Zentralblatt für Bakteriologie, Para-
sitenkunde, Infektionskrankheiten und
Hygiene, I. Orig.* 208, 320 - 329
(1968)
- SCHWARZ, J.L. and D. PERLMAN : Antibiotic resistance
mechanisms in *Mycoplasma*- species.
J. Antibiot. 24, 575 - 582 (1971)

- TOUNTELOTTE, M.E. : Protein- synthesis in Mycoplasma
In: L. HAYFLICK : The Mycoplasmatales
and the L-phase of Bacteria
North Holland Publishing Company (1969)
p. 456
- VASQUEZ, D. and R.E. MONRO : Effect of some inhibitors of
protein synthesis on the binding of
aminoacyl t- RNA to ribosomal sub-
units.
Biochim. Biophys. Acta, 142, 155
(1967)
- WALTER, A.M. und L. HEILMEYER : Antibiotica- Fibel, 3. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1969)
S. 260 - 297, 341, 350, 352 - 359,
434 - 438
- WHITEHILL, A.R. and J.S. KISER : The effectiveness of se-
veral Tetracyclines in the control
of an experimental PPLO (M.galli-
septicum) infection in chickens.
Avian Dis. 5, 547 - 555 (1961)
- WIK, R. und H. ROSER : Nachweis von Mycoplasma- Infektionen
in einem Routinelaboratorium.
MMW 19, 888 - 889 (1970)
- YAMAMOTO, R. and H. ADLER : The effect of certain anti-
biotics and chemical agents on
pleuropneumonia- like organisms
of avian origin.
Am. J. Vet. Res. 17, 538 - 542
(1956)

YODER, H.W.jr. and M.S. HOFSTAD : Evaluation of Tylosin
in preventing egg transmission of
Mycoplasma gallisepticum in chickens.
Avian Dis. 9, 291 - 301 (1965)

ZANELLA, A. and E. MAZZARRI : Control of avian Myco-
plasmosis.
Agricoltura, April 1966, p. 1 - 21

ZAVADOVA - SUCHANOVA, M. und M. RYC : Die Vermehrung
menschlicher *Mycoplasma*arten.
In: M. SPRÜSSIG and W. WITZLEB :
Mycoplasma diseases of man
VEB Gustav Fischer Verlag Jena (1968)
p. 41 - 44

ZOLLI, Z.jr., M.J. GALLIAN, G.S. SHEA, K.E. PRICE :
An in vitro method for the determi-
nation of antibiotic sensitivity of
avian pleuropneumonia- like orga-
nisms.
J. Bact. 72, 720 (1956)

ZOLLI, Z.jr. and W.L. MUTH : Effect of Spectinomycin on
experimentally induced CRD (*M. galli-
septicum*) in chickens.
Poultry Sci. 46, 1342 (1967)

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich Frau Professor Dr. I. Gylstorff für die Überlassung des Themas und für die jederzeitige freundliche Unterstützung danken.

Frau Dr. Gerlach gilt mein besonderer Dank für die hilfreiche Unterstützung und die vielen Anregungen während der Versuche und bei der Auswertung der Ergebnisse.

Bei Frau Schneider und Frau Endl und bei allen Angehörigen der Klinik bedanke ich mich für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft.

K LEBENS LAUF

Am 28.4.1948 wurde ich, Klaus Rüdiger Raiber, als Sohn des Ingenieurs Franz Raiber und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Mathiaschk in Ludwigsburg/Wttbg. geboren.

Nach 4-jähriger Grundschulzeit in Ludwigsburg besuchte ich das Friedrich-Schiller-Gymnasium Ludwigsburg, das Christoph-Scheiner-Gymnasium in Ingolstadt/Donau und das Dominikus-Zimmermann-Gymnasium Landsberg/Lech. Dort legte ich 1969 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1970 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität München. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich im April 1975.

Meine Veterinärpraktikantenzeit legte ich bei Herrn Dr. Holl in Zwiefaltendorf/Wttbg. ab.

Mit der vorliegenden Arbeit war ich seit Juni 1973 am Lehrstuhl für Hausgeflügel, Zier- und Zoovögel beschäftigt.

